

**Maria da Graça Caminha Vidal**

**RELAÇÃO DA EXPRESSIVIDADE DAS PROTEÍNAS P53 E P16 NO  
CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS NA CAVIDADE ORAL,  
LARINGE E FARINGE COM A SOBREVIVÊNCIA: RISCO OU PROTEÇÃO?**

Tese apresentada à Universidade Federal  
de São Paulo – Escola Paulista de  
Medicina, para obtenção do Título de  
Doutora em Ciências.

São Paulo

2019

**Maria da Graça Caminha Vidal**

**RELAÇÃO DA EXPRESSIVIDADE DAS PROTEÍNAS P53 E P16 NO  
CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS NA CAVIDADE ORAL,  
LARINGE E FARINGE COM A SOBREVIVÊNCIA: RISCO OU PROTEÇÃO?**

Tese apresentada à Universidade Federal  
de São Paulo – Escola Paulista de  
Medicina, para obtenção do Título de  
Doutora em Ciências.

**Orientador**

Prof. Dr. Onivaldo Cervantes

São Paulo

2019

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca da Unifesp São José dos campos  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

CC183r Caminha Vidal, Maria da Graça  
RELAÇÃO DA EXPRESSIVIDADE DAS PROTEÍNAS P53 E  
P16 NO CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS NA CAVIDADE  
ORAL, LARINGE E FARINGE COM A SOBREVIVÊNCIA: RISCO  
OU PROTEÇÃO? / Maria da Graça Caminha Vidal  
a Onivaldo Cervantes. -- São José dos Campos,  
2019.  
228 p.  
RELATIONSHIP OF EXPRESSIVENESS OF P53 AND P16  
PROTEINS IN SQUAMOUS CELL CARCINOMA IN THE ORAL  
CAVITY, LARYNX AND PHARYNX WITH SURVIVAL: RISK  
OR PROTECTION?

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em  
Doutorado em Biotecnologia) -- Universidade  
Federal de São Paulo - Instituto de Ciência e  
Tecnologia, 2019.

1. proteínas p53 e p16. 2. carcinom. 3.  
cavidade oral. 4. laringe. 5. faringe. I.  
Cervantes, Onivaldo, orient. II. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO**  
**ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM OTORRINOLARINGOLOGIA**  
**E CIRURGIA DE CABEÇA E PESCOÇO**

Chefe do Departamento: Prof. Dr. Marcio Abrahão

Coordenadores do Curso de Pós-Graduação: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Norma de  
Oliveira Penido e Prof. Dr. Eduardo Macoto Kosugi

**Maria da Graça Caminha Vidal**

**RELAÇÃO DA EXPRESSIVIDADE DAS PROTEÍNAS P53 E P16 NO CARCINOMA  
DE CÉLULAS ESCAMOSAS NA CAVIDADE ORAL, LARINGE E FARINGE COM  
A SOBREVIVÊNCIA: RISCO OU PROTEÇÃO?**

**Presidente da Banca**

Prof. Doutor Onivaldo Cervantes\_\_\_\_\_

**Banca Examinadora**

Prof. Doutor Carlos Neutzling Lehn\_\_\_\_\_

Prof. Doutor Geraldo Pereira Jotz\_\_\_\_\_

Prof. Doutor Rogério Aparecido Dedivitis\_\_\_\_\_

Prof. Doutor Rodrigo Oliveira Santos\_\_\_\_\_

“Quanto maior conhecimento, menor o ego, quanto maior o ego,  
menor o conhecimento”

Albert Einstein

“Cada segundo é tempo para se mudar tudo para sempre”

Charles Chaplin

## Dedicatória

Aos meus pais Epaminondas Duarte Vidal e Conceição Caminham Vidal, “*in memoriam*”, que me deram a vida e há muito tempo encontram-se num plano superior. Porém, recebi deles sentimentos e valores inestimáveis para a formação de um ser humano de caráter: amor, honestidade, ética, força de trabalho, dedicação, generosidade e respeito pelo nosso semelhante.

Ao meu filhinho Vinícius, “*in memoriam*”, uma luz na minha vida para a esperança e compreensão da nossa trajetória na Terra.

À família Vidal, da qual tenho orgulho de pertencer, pois dela recebi amor, carinho e compreensão por parte de tio(a)s e primo(a)s, que entenderam e aceitaram as minhas escolhas pela dedicação ao trabalho, o que justificava muitas vezes o meu atraso ou a minha ausência nas reuniões familiares.

Aos pacientes que ao longo dos anos mostraram o quanto cada um deles é importante na nossa profissão. Eles são a razão do nosso trabalho na busca da cura, quando possível, e de um tratamento mais humano nas situações adversas ou irreversíveis para a medicina.

Aos meus residentes e alunos que instigam o aprimoramento contínuo no ensino e aprendizado mútuos nesse universo ímpar da Medicina.

Aos colegas e amigos que fazem parte da nossa história, nos ouvindo e nos motivando a seguir em frente, enfrentando os desafios e as dificuldades diárias.

*“À minha querida São Paulo, eterna Paulicéia desvairada que guarda dentro de si, tantos sonhos, desafios e conhecimentos. É multicores, de noite e de dia, é constante, destemida como uma criança, racional como um adulto, sábia como um velho, sedutora como uma amante... É vida, é morte, são transformações....Mas acima de tudo é São Paulo, generosa e autêntica... Eterna terra da garoa de prazeres e deveres, de alegrias e tristezas, do belo e do feio, de ganhos e perdas, do certo e do errado...Palco de muitas posições e contradições...Um carrossel de talentos e desejos! Base de muitos caminhos: Ciência, Arte, Medicina e muito trabalho... Sempre receptiva, clama por todos e instiga o indivíduo...Minha amada São Paulo, por tudo que significa na esperança e na vida de milhões de pessoas: Meu muito obrigada!!!*

## **Agradecimentos**

**Ao Professor Doutor Onivaldo Cervantes**, querido professor que me acolheu na Escola Paulista com tanto carinho e amizade, desde o mestrado, acreditando no meu trabalho e na minha capacidade de realizar essa pesquisa e publicar trabalhos que somem ao tratamento dos nossos tão sofridos pacientes com câncer de cabeça e pescoço.

**Ao Professor Doutor Marcio Abraão**, chefe do Departamento de Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da Escola Paulista de Medicina, estimado professor, sempre receptivo, acolhendo a todos e incentivando novas conquistas.

**À Professora Doutora Norma de Oliveira Penido**, Coordenadora da Pós-Graduação, motivadora e muito ativa entre os pós-graduandos, ajudando sempre quando solicitada, esclarecendo as dúvidas a respeito das teses e artigos científicos.

**Ao Professor Doutor Carlos Neutzling Lehn, ao Professor Doutor Rogério Aparecido Dedivitis, ao Professor Doutor Rodrigo Oliveira Santos**, pelas valiosas sugestões e críticas na qualificação, contribuindo para o desenvolvimento da tese.

**Ao Programa de Pós-Graduação de Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço da Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina**, berço tradicional e notável no pioneirismo da pesquisa e na valorização da assistência e o ensino médico, a minha eterna gratidão pela oportunidade de desenvolver essa tese.

**Aos colegas, residentes e alunos da Escola Paulista de Medicina**, pelo companheirismo e amizade desenvolvidos ao longo desses anos.

**À Maria José da Silva: Zezé, a nossa querida secretária da Pós-Graduação**, sempre presente e solícita, atendendo a todos com carinho; amiga e resolutiva para todas as horas.

**Ao José Ítalo França**, com sua análise estatística precisa que contribuiu de forma esclarecedora e fidedigna os resultados da tese, enaltecendo a pesquisa científica.

**Ao Professor Doutor Ali Amar** por ideias pontuais e importantes, elucidando a melhor forma de desenvolvimento da tese.



**Ao Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço, fundado em 04 de outubro de 1994, a minha primeira conquista no Hospital Universitário de Santa Maria - RS,** que conta hoje com mais dois colegas, Dr. Marcos André dos Santos e o Dr. Claudio Silveira, além dos nossos próprios residentes da Cirurgia de Cabeça e Pescoço, residentes da Cirurgia Geral, graduandos da medicina; e às nossas estimadas técnicas de enfermagem, Marcinha Venturini, Márcia Colveiro, Marta Ferreira, Paula Doeber e à enfermeira Daiana Ilha, todas presentes e atuantes com os nossos pacientes, tratando-os com dedicação e respeito.

**Ao Serviço de Patologia do Hospital Universitário de Santa Maria – RS,** Doutoras Marta Pires da Rocha, Melissa Falster Daubermann, Nara Maria Beck Martins, **e especialmente à minha querida e estimada colega Dra. Alessandra Saldanha Bastianello,** a qual foi incansável na coordenação do preparo dos blocos de parafina, das lâminas do H.E., lâminas da imunohistoquímica e análise das proteínas p53 e p16 nos carcinomas de células escamosas da cavidade oral, laringe e faringe.

**Ao Dr. Carlos Renato Almeida Melo, a Líllian Marquezini da Silva e a Geovana de Oliveira,** que disponibilizaram o Equipamento Benchmark GX Ventana (Alemanha), com método automatizado e trabalharam no preparo das lâminas de imunohistoquímica, para qualificar o método e a fidelidade dos resultados.

**À Maiara Botega, a nossa bolsista,** que prestou inestimável auxílio na busca ativa dos pacientes, além da organização do banco de dados dos pacientes com carcinoma de células escamosas da cavidade oral, laringe e faringe.

**Aos meus queridos residentes da Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital Universitário de Santa Maria – RS, Aliende Lengler Abentroth, Fernando Cogo Manduca, Aloysio Enck Neto e Lucas Spina,** os meus maiores parceiros que incentivaram e auxiliaram nos protocolos de atendimento aos pacientes, nas biópsias e na participação das cirurgias, além de compreenderem a minha ausência por ocasião das viagens a São Paulo.

**Ao Professor Doutor Geraldo Pereira Jotz,** estimado professor e muito atuante na Cirurgia de Cabeça e Pescoço, no estado do RS, contribuindo para maior qualificação da especialidade, monitorizando a prática da mesma com seriedade, ética e respeito ao paciente.

**Aos Primeiros Mestres da Cirurgia Geral, Dr. Delmo Amendola (*in memoriam*), Dr. Francisco Omizzolo, Dr. Roberto Lemos, Dr. Valter Antonio Noal e Dra. Yvelise Fritsch de Verney** na Universidade Federal de Santa Maria e no Hospital de Caridade Astrogildo de Azevedo de Santa Maria, que incentivaram e despertaram o amor pela cirurgia.

**Aos Doutores Antero Scherer (*in memoriam*) e Augusto Ramos do Prado, diretores do HUSM (1994-1998)**, que oportunizaram condições para o início do Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço no Hospital Universitário de Santa Maria.

**Ao Serviço de Otorrinolaringologia do Hospital Universitário de Santa Maria e do Hospital de Caridade Astrogildo de Azevedo**, que muito contribuíram e dividimos juntos a responsabilidade no diagnóstico e no tratamento dos pacientes com Câncer na Via Aérea Digestiva Superior, em especial, o **Professor Doutor Pedro Coser e a Dra. Maria José Coser**, que me receberam com muito carinho e amizade no Hospital Universitário de Santa Maria, e o **Dr. Luiz Carlos Alves de Oliveira e Irajá Alves de Oliveira Junior**, no Hospital de Caridade Astrogildo de Azevedo de Santa Maria, em 1994.

**As Professoras Doutoras Elaine Resener, Tânia Resener e Suzinara de Lima**, respectivamente, Superintendente, Coordenadora da Residência Médica e Coordenadora da Enfermagem do Hospital Universitário de Santa Maria, pelo apoio e incentivo nas atividades da nossa Residência Médica em Cirurgia de Cabeça e Pescoço.

**Ao Professor Dr. Nilton Tabajara Herter**, pelos meus primeiros passos no aprendizado da especialidade de Cirurgia de Cabeça e Pescoço, no Hospital Santa Rita de Porto Alegre.

Aos Hospitais que muito contribuíram para a minha formação na Cirurgia Geral, Trauma, Oncológica e Cabeça e Pescoço: **Hospital de Caridade Astrogildo de Azevedo de Santa Maria-RS, Hospital Universitário de Santa Maria-RS, Hospital Ernesto Dornelles de Porto Alegre-RS, Hospital Pronto Socorro de Porto Alegre-RS, Hospital Santa Rita de Porto Alegre-RS, Hospital Universitário São Paulo-SP e Hospital AC. Camargo de São Paulo -SP.**

**Ao meu querido colega Neimar Scolari**, sempre solidário e generoso ao cuidar dos meus pacientes quando solicitado, por ocasião da minha ausência em virtude das atividades do doutorado em São Paulo.

**Aos meus funcionários Rita de Cássia Folgiarini, Bem-hur Lencina, Beatriz Pedroso e à Cecília Oliveira,** que acompanharam toda a minha trajetória, organizando e auxiliando minha agenda profissional e pessoal para aperfeiçoar as minhas atividades no desenvolvimento da tese.

**A Deus, acima de tudo!** Nossa maior energia, a perfeição na evolução moral sempre presente, misericordioso e justo em todos os momentos em benefício da nossa evolução e aprendizado no planeta Terra.

## Sumário

Dedicatória.....	vi
Agradecimentos.....	vii
Lista de Figuras.....	xiii
Lista de Tabelas.....	xiv
Lista de Figuras.....	xvi
Lista de Sigla, Abreviaturas e Símbolos.....	xx
Resumo.....	xii
Abstract.....	xxiii
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>25</b>
<b>1.1 O processo da Carcinogênese .....</b>	<b>26</b>
<b>1.2 Produção de Proteínas – Marcadores .....</b>	<b>27</b>
1.2.1 Relação dos Marcadores com o Câncer de Cabeça e Pescoço .....	28
<b>1.3 Revisão da Literatura .....</b>	<b>32</b>
1.3.1 A proteína p53.....	32
<b>1.3.2 A proteína p16 e a relação HPV.....</b>	<b>39</b>
<b>1.3.3 Associação entre os marcadores p53 e p16 .....</b>	<b>49</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>56</b>
<b>2.1 Objetivo Geral.....</b>	<b>56</b>
2.1.1 Objetivos específicos.....	56
<b>3. METODOLOGIA .....</b>	<b>59</b>
<b>3.1 Critérios de Inclusão .....</b>	<b>60</b>
<b>3.2 Critérios de Exclusão.....</b>	<b>61</b>
<b>3.3 Avaliação Imunohistoquímica: Metodologia.....</b>	<b>63</b>
3.3.1 A análise da expressividade das proteínas p53 e p16 pela imunohistoquímica .....	63
3.3.2 Imunohistoquímica .....	64
<b>3.4 Metodologia Estatística .....</b>	<b>72</b>
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>74</b>
<b>4.1 Cavidade Oral .....</b>	<b>74</b>
4.1.1 Em relação a proteína p53.....	72
4.1.2. Em relação à proteína p16 .....	88
4.1.3. Aspectos das Proteínas p53 e p16 isoladas ou associadas.....	99

<b>4.2 Laringe</b> .....	105
4.2.1 Em relação a proteína p53.....	103
4.2.2 Em relação à proteína p16 .....	118
4.2.3 Aspectos das Proteínas p53 e p16 isoladas ou associadas.....	128
<b>4.3 Faringe</b> .....	134
4.3.1 Em relação à proteína p53 .....	138
4.3.2 Em relação à proteína p16 .....	149
4.3.3 Situação das proteínas p53 e p16 isoladas ou associadas .....	160
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	168
<b>5.1 Cavidade Oral</b> .....	168
5.1.1 Proteína p53.....	170
5.1.2 Proteína p16.....	174
<b>5.2 Laringe</b> .....	179
5.2.1 Proteína p53.....	181
5.2.2 Proteína p16.....	184
<b>5.3 Faringe</b> .....	188
5.3.1 Proteína p53.....	190
5.3.2 Proteína p16.....	194
<b>6 CONCLUSÕES</b> .....	206
<b>7 REFERÊNCIAS</b> .....	208
Anexo 1 – Parecer do Conselho de Pesquisa e Extensão – UFSM.....	217
Anexo 2 – Autorização da Comissão de Ética.....	220
Anexo 3 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).....	221
Anexo 4 – Termo de Confidencialidade.....	224
Apêndice 1 – Registro de expressividade (imunohistoquímica) p53 e p16 nos pacientes com CEC de boca, laringe e faringe.....	226
Bibliografia consultada.....	228

## Lista de Figuras

Figura 1.	CEC de Cavidade Oral(a).....	62
Figura 2.	CEC de Laringe(a).....	62
Figura 3.	CEC de Hipofaringe(a).....	62
Figura 4.	CEC de Cavidade Oral(b).....	62
Figura 5.	CEC de Laringe(b).....	62
Figura 6.	CEC de Orofaringe-Palato Mole, Pilar Amigdaliano(b).....	62
Figura 7.	CEC de Cavidade Oral(c).....	62
Figura 8.	CEC de Laringe(c).....	62
Figura 9.	CEC de Orofaringe- Base de Língua(c).....	62
Figura 10.	CEC - H.E. Campo tamanho com aumento 20 vezes.....	63
Figura 11.	CEC- H.E. Campo tamanho com aumento 40 vezes.....	63
Figura 12.	Equipamento Benchmark GX Ventana (Alemanha).....	65
Figura 13.	Local de recepção das lâminas.....	65
Figura 14.	Lâminas prontas para a avaliação para a Imunohistoquímica.....	65
Figura 15.	p53 negativo: Campo Tamanho com aumento 40 vezes.....	66
Figura 16.	p53 nível A: Campo Tamanho com aumento 40 vezes.....	66
Figura 17.	p53 nível B: Campo Tamanho com aumento 40 vezes.....	66
Figura 18.	p53 nível C: Campo Tamanho com aumento 40 vezes.....	66
Figura 19.	p16 grau 0: Campo Tamanho com aumento 40 vezes.....	67
Figura 20.	p16 grau 1: Campo Tamanho com aumento 40 vezes.....	67
Figura 21.	p16 grau 2: Campo Tamanho com aumento 40 vezes.....	67
Figura 22.	p16 grau 3 Campo Tamanho com aumento 40 vezes.....	67
Figura 23.	Foto de Lâminas p53 e p16 (2 pacientes) .....	68
Figura 24.	Foto de Lâminas p53 e p16 (1 paciente) .....	68
Figura 25.	Lâminas p53 positivo: Níveis A, B, C (3 pacientes) .....	68
Figura 26.	Lâminas p16 positivo: Graus 1, 2, 3 (3 pacientes) .....	68
Figura 27.	Exemplo de Lâminas de pacientes com os p53 e p16 negativos (2 pacientes).....	69
Figura 28.	Exemplo de bloco de parafina (tumor) .....	69
Figura 29.	Blocos de Parafina.....	69
Figura 30.	Reagentes para H.E. ....	69
Figura 31.	Anticorpos para reação.....	69
Figura 32.	Proteína p16 (reagente) .....	70
Figura 33.	Colocação do reagente no equipamento Ventana (dispositivo).....	70
Figura 34.	Microfotografias das proteínas p53 positiva e p53 negativa.....	70
Figura 35.	Microfotografias das proteínas p 16 positiva e p16 negativa.....	72

## Lista de Gráficos

Gráficos 1 e 2.	Relação do nível da proteína p53 com óbito geral.....	83
Gráficos 3 e 4.	Relação da sobrevida dos pacientes com proteína p53 – óbito geral.....	84
Gráficos 5 e 6.	Relação do nível da proteína p53 com a sobrevida dos pacientes - óbito pela doença.....	86
Gráficos 7 e 8.	Relação da sobrevida dos pacientes com a proteína p53 - óbito pela doença.....	87
Gráficos 9 e 10.	Relação do grau da proteína p16 com a sobrevida dos pacientes - óbito geral.....	94
Gráficos 11 e 12.	Relação da sobrevida dos pacientes com a proteína p16 - óbito geral.....	95
Gráficos 13 e 14.	Relação do grau da proteína p16 com a sobrevida dos pacientes - óbito pela doença.....	97
Gráficos 15 e 16.	Relação da Sobrevida dos pacientes com proteína p16 - óbito pela doença.....	98
Gráficos 17 e 18.	Sobrevida dos pacientes com as proteínas p53 e/ou p16 - óbito geral.....	102
Gráficos 19 e 20.	Sobrevida dos pacientes com as proteínas p53 e/ou p16 - óbito pela doença.....	103
Gráfico 21.	Estadiamento e Disseminação Linfonodal da Situação das Proteínas p53 e p16 – Cavidade Oral.....	104
Gráfico 22.	Estadiamento e Disseminação Linfonodal da Situação da Proteína p53 – Cavidade Oral.....	104
Gráfico 23.	Estadiamento e Disseminação Linfonodal da Situação da Proteína p16 – Cavidade Oral.....	105
Gráficos 24 e 25.	Relação do nível da proteína p53 com a sobrevida dos pacientes - óbito geral.....	114
Gráficos 26 e 27.	Relação da sobrevida dos pacientes com proteína p53 - óbito geral.....	115
Gráficos 28 e 29.	Relação do nível da proteína p53 com a sobrevida dos pacientes - óbito pela doença.....	116
Gráficos 30 e 31.	Relação da sobrevida dos pacientes com a proteína p53 - óbito pela doença.....	117
Gráficos 32 e 33.	Relação do grau da proteína p16 com a sobrevida dos pacientes - óbito geral.....	134
Gráficos 34 e 35.	Relação da sobrevida dos pacientes com a proteína p16 - óbito geral.....	125
Gráficos 36 e 37.	Relação do grau da proteína p16 com a sobrevida dos pacientes - óbito pela doença.....	126
Gráficos 38 e 39.	Relação da Sobrevida dos pacientes com proteína p16 - óbito pela doença.....	127
Gráficos 40 e 41.	Sobrevida dos pacientes com as proteínas p53 e/ou p16 - óbito geral.....	132
Gráficos 42 e 43.	Sobrevida dos pacientes com as proteínas p53 e/ou p16 - óbito pela doença.....	133
Gráfico 44.	Estadiamento e disseminação linfonodal da situação das proteínas p53 e p16 – Laringe.....	133

Gráfico 45.	Estadiamento e disseminação linfonodal da situação da proteína p53 – Laringe.....	134
Gráfico 46.	Estadiamento e disseminação linfonodal da situação da proteína p16 – Laringe.....	134
Gráficos 47 e 48.	Relação do nível da proteína p53 com a sobrevida dos pacientes-óbito geral.....	145
Gráficos 49 e 50.	Relação da sobrevida dos pacientes com proteína p53 - óbito geral.....	146
Gráficos 51 e 52.	Relação do nível da proteína p53 com a sobrevida dos pacientes - óbito pela doença.....	147
Gráficos 53 e 54.	Relação da sobrevida dos pacientes com a proteína p53 - óbito pela doença.....	148
Gráficos 55 e 56.	Relação do grau da proteína p16 com a sobrevida dos pacientes - óbito geral.....	155
Gráficos 57 e 58.	Relação da sobrevida dos pacientes com a proteína p16 - óbito geral.....	156
Gráficos 59 e 60.	Relação do grau da proteína p16 com a sobrevida dos pacientes - óbito pela doença.....	158
Gráficos 61 e 62.	Relação da Sobrevida dos pacientes com proteína p16 - óbito pela doença.....	159
Gráficos 63 e 64.	Sobrevida dos pacientes com as proteínas p53 e/ou p16 - óbito geral.....	163
Gráficos 65 e 66.	Sobrevida dos pacientes com as proteínas p53 e/ou p16 - óbito pela doença.....	164
Gráfico 67.	Estadiamento e Disseminação Linfonodal da Situação das Proteínas p53 e p16 – Faringe.....	165
Gráfico 68.	Estadiamento e Disseminação Linfonodal da Situação da Proteína p53 – Faringe.....	165
Gráfico 69.	Estadiamento e Disseminação Linfonodal da Situação da Proteína p16 – Faringe.....	166



## Lista de Tabelas

Tabela 1.	Localização na cavidade oral: subsítios.....	74
Tabela 2.	Relação da frequência da proteína p53 na cavidade oral.....	74
Tabela 3.	Relação do nível da expressividade da proteína p53 na cavidade oral.....	75
Tabela 4.	Relação da frequência da proteína p16 na cavidade oral.....	75
Tabela 5.	Relação do grau da expressividade da proteína p16 na cavidade oral.....	75
Tabela 6.	Relação cruzada dos níveis e graus entre as proteínas p53 e p16.	76
Tabela 7.	Situação das proteínas p53 e p16 e a frequência.....	76
Tabela 8.	Relação da proteína p53 com a idade.....	76
Tabela 9.	Relação da proteína p16 com a idade.....	76
Tabela 10.	Relação da proteína p53 com o gênero.....	77
Tabela 11.	Relação da proteína p53 com a localização na cavidade oral.....	77
Tabela 12.	Relação da proteína p 53 com a localização na língua e/ou soalho oral.....	78
Tabela 13.	Relação da proteína p53 com o tratamento.....	78
Tabela 14.	Relação da proteína p53 com a cirurgia no tratamento.....	79
Tabela 15.	Relação da proteína p53 com o estadiamento.....	79
Tabela 16.	Relação da proteína p53 com o tumor (T).....	79
Tabela 17.	Relação da proteína p53 com a disseminação linfática.....	80
Tabela 18.	Relação da proteína p53 e o linfonodo (N).....	80
Tabela 19.	Relação da proteína p53 com a recidiva.....	81
Tabela 20.	Relação da proteína p53 com o óbito geral.....	81
Tabela 21.	Relação da proteína p53 com o óbito pela doença.....	81
Tabela 22.	Relação do nível da proteína p53 com o óbito geral.....	82
Tabela 23.	Relação do nível da proteína p53 com o óbito pela doença.....	82
Tabela 24.	Modelo de Cox univariado da proteína p53: óbito geral.....	85
Tabela 25.	Modelo de Cox da proteína p53 ajustada pelo sexo e idade.....	85
Tabela 26.	Modelo de Cox univariado da proteína p53: óbito pela doença...	87
Tabela 27.	Modelo de Cox da proteína p53 ajustada pelo sexo e idade.....	87
Tabela 28.	Relação da proteína p16 com o gênero.....	88
Tabela 29.	Relação da proteína p16 com a localização na cavidade oral.....	88
Tabela 30.	Relação da proteína p16 com a localização na língua e/ou soalho oral.....	89
Tabela 31.	Relação da proteína p16 com o tratamento.....	89
Tabela 32.	Relação da proteína p16 com a cirurgia no tratamento.....	90
Tabela 33.	Relação da proteína p16 com o estadiamento.....	90
Tabela 34.	Relação da proteína p16 com o tumor (T).....	90
Tabela 35.	Relação da proteína p16 com a disseminação linfonodal.....	91
Tabela 36.	Relação da proteína p16 com o linfonodo (N).....	91
Tabela 37.	Relação da proteína p16 com a recidiva.....	92
Tabela 38.	Relação da proteína p16 com o óbito geral.....	92
Tabela 39.	Relação da proteína p16 com o óbito pela doença.....	92
Tabela 40.	Relação do grau da proteína p16 com o óbito geral.....	93
Tabela 41.	Relação do grau da proteína p16 com o óbito pela doença.....	93

Tabela 42.	Modelo de Cox univariado da proteína p16: óbito geral.....	96
Tabela 43.	Modelo de Cox da proteína p16 ajustada pelo sexo e idade.....	96
Tabela 44.	Modelo de Cox univariado da proteína p16: Óbito pela doença...	98
Tabela 45.	Modelo de Cox da proteína p16 ajustada pelo sexo e idade.....	98
Tabela 46.	Relação das proteínas p53 e/ou p16 com a localização.....	99
Tabela 47.	Relação das proteínas p53 e/ou p16 com o estadiamento.....	99
Tabela 48.	Relação das proteínas p53 e/ou p16 com o tumor (T).....	100
Tabela 49.	Relação das proteínas p53 e/ou p16 com a disseminação linfonodal.....	100
Tabela 50.	Relação das proteínas p53 e/ou p16 com o linfonodo (N).....	100
Tabela 51.	Relação das proteínas p53 e/ou p16 com a recidiva.....	101
Tabela 52.	Relação das proteínas p53 e/ou p16 com o óbito geral.....	101
Tabela 53.	Relação das proteínas p53 e/ou p16 com o óbito pela doença....	101
Tabela 54.	Localização na Laringe: subsítios.....	105
Tabela 55.	Relação da frequência da proteína p53 na laringe.....	106
Tabela 56.	Relação do nível da expressividade da proteína p53 na laringe...	106
Tabela 57.	Relação da frequência da proteína p16 na laringe.....	106
Tabela 58.	Relação do grau da expressividade da proteína p16 na laringe...	107
Tabela 59.	Relação cruzada dos níveis e graus entre as proteínas p53 e p16.	107
Tabela 60.	Situação das proteínas p53 e/ou p16 e a frequência.....	107
Tabela 61.	Relação da proteína p53 com a idade.....	108
Tabela 62.	Relação da proteína p16 com a idade.....	108
Tabela 63.	Relação da proteína p53 com o gênero.....	108
Tabela 64.	Relação da proteína p53 com a localização na laringe.....	109
Tabela 65.	Relação da proteína p53 com o tratamento.....	109
Tabela 66.	Relação da proteína p53 com a cirurgia no tratamento.....	110
Tabela 67.	Relação da proteína p53 com o estadiamento.....	110
Tabela 68.	Relação da proteína p53 com o tumor (T).....	110
Tabela 69.	Relação da proteína p53 com a disseminação linfática.....	111
Tabela 70.	Relação da proteína p53 e o linfonodo (N).....	111
Tabela 71.	Relação da proteína p53 com a recidiva.....	112
Tabela 72.	Relação da proteína p53 com o óbito geral.....	112
Tabela 73.	Relação da proteína p53 com o óbito pela doença.....	112
Tabela 74.	Relação do nível da proteína p53 com o óbito geral.....	113
Tabela 75.	Relação do nível da proteína p53 com o óbito pela doença.....	113
Tabela 76.	Modelo de Cox univariado da proteína p53: óbito geral.....	115
Tabela 77.	Modelo de Cox da proteína p53 ajustada pelo sexo e idade.....	116
Tabela 78.	Modelo de Cox univariado da proteína p53: óbito pela doença....	118
Tabela 79.	Modelo de Cox da proteína p53 ajustada pelo sexo e idade.....	118
Tabela 80.	Relação da proteína p16 com o gênero.....	118
Tabela 81.	Relação da proteína p16 com a localização na laringe.....	119
Tabela 82.	Relação da proteína p16 com o tratamento.....	119
Tabela 83.	Relação da proteína p16 com a cirurgia no tratamento.....	120
Tabela 84.	Relação da proteína p16 com o estadiamento.....	120
Tabela 85.	Relação da proteína p16 com o tumor (T).....	120
Tabela 86.	Relação da proteína p16 com a disseminação linfonodal.....	121
Tabela 87.	Relação da proteína p16 com o linfonodo (N).....	121
Tabela 88.	Relação da proteína p16 com a recidiva.....	122
Tabela 89.	Relação da proteína p16 com o óbito geral.....	122
Tabela 90.	Relação da proteína p16 com o óbito pela doença.....	122

Tabela 91.	Relação do grau da proteína p16 com o óbito geral.....	123
Tabela 92.	Relação do grau da proteína p16 com o óbito pela doença.....	123
Tabela 93.	Modelo de Cox univariado da proteína p16: óbito geral.....	124
Tabela 94.	Modelo de Cox da proteína p16 ajustada pelo sexo e idade.....	124
Tabela 95.	Modelo de Cox univariado da proteína p16: óbito pela doença...	128
Tabela 96.	Modelo de Cox da proteína p16 ajustada pelo sexo e idade.....	128
Tabela 97.	Relação das proteínas p53 e/ou p16 com a localização.....	128
Tabela 98.	Relação das proteínas p53 e/ou p16 com o estadiamento.....	129
Tabela 99.	Relação das proteínas p53 e/ou p16 com o tumor (T).....	129
Tabela 100.	Relação das proteínas p53 e/ou p16 com a disseminação linfonodal.....	129
Tabela 101.	Relação das proteínas p53 e/ou p16 com o linfonodo (N).....	130
Tabela 102.	Relação das proteínas p53 e/ou p16 com a recidiva.....	130
Tabela 103.	Relação das proteínas p53 e/ou p16 com o óbito geral.....	130
Tabela 104.	Relação das proteínas p53 e/ou p16 com o óbito pela doença.	131
Tabela 105.	Localização na Faringe – subsítios.....	135
Tabela 106.	Localização na Faringe – sítios.....	135
Tabela 107.	Relação da frequência da proteína p53 na faringe.....	135
Tabela 108.	Relação do nível da expressividade da proteína p53 na faringe..	136
Tabela 109.	Relação da frequência da proteína p16 na faringe.....	136
Tabela 110.	Relação do grau da expressividade da proteína p16 na faringe...	136
Tabela 111.	Situação das proteínas p53 e/ou p16 e a frequência.....	136
Tabela 112.	Relação cruzada dos níveis e graus entre as proteínas p53 e p16.	137
Tabela 113.	Relação da proteína p53 com a idade.....	137
Tabela 114.	Relação da proteína p16 com a idade.....	137
Tabela 115.	Relação da proteína p53 com o gênero.....	138
Tabela 116.	Relação da proteína p53 com os subsítios da faringe.....	138
Tabela 117.	Relação da proteína p 53 com os sítios na faringe.....	139
Tabela 118.	Relação da proteína p53 com o tratamento.....	139
Tabela 119.	Relação da proteína p53 com a cirurgia no tratamento.....	140
Tabela 120.	Relação da proteína p53 com o estadiamento.....	140
Tabela 121.	Relação da proteína p53 com o tumor (T).....	140
Tabela 122.	Relação da proteína p53 com a disseminação linfática.....	141
Tabela 123.	Relação da proteína p53 e o linfonodo (N).....	141
Tabela 124.	Relação da proteína p53 com a recidiva.....	142
Tabela 125.	Relação da proteína p53 com mais de um tumor na CP.....	142
Tabela 126.	Relação da proteína p53 com o óbito geral.....	142
Tabela 127.	Relação da proteína p53 com o óbito pela doença.....	143
Tabela 128.	Relação do nível da proteína p53 com o óbito geral.....	143
Tabela 129.	Relação do nível da proteína p53 com o óbito pela doença.....	143
Tabela 130.	Modelo de Cox univariado da proteína p53: óbito geral.....	146
Tabela 131.	Modelo de Cox da proteína p53 ajustada pelo sexo e idade.....	146
Tabela 132.	Modelo de Cox Univariado da proteína p53: óbito pela doença...	148
Tabela 133.	Modelo de Cox da proteína p53 ajustada pelo sexo e idade.....	149
Tabela 134.	Relação da proteína p16 com o gênero.....	149
Tabela 135.	Relação da proteína p16 com os subsítios da faringe.....	150
Tabela 136.	Relação da proteína p16 com os sítios da faringe.....	150
Tabela 137.	Relação da proteína p16 com o tratamento.....	151
Tabela 138.	Relação da proteína p16 com a cirurgia no tratamento.....	151
Tabela 139.	Relação da proteína p16 com o estadiamento.....	151

Tabela 140.	Relação da proteína p16 com o tumor (T).....	152
Tabela 141.	Relação da proteína p16 com a disseminação linfonodal.....	152
Tabela 142.	Relação da proteína p16 com o linfonodo (N).....	153
Tabela 143.	Relação da proteína p16 com a recidiva.....	153
Tabela 144.	Relação da proteína p16 com o óbito geral.....	153
Tabela 145.	Relação da proteína p16 com o óbito pela doença.....	154
Tabela 146.	Relação do grau da proteína p16 com o óbito geral.....	154
Tabela 147.	Relação do grau da proteína p16 com o óbito pela doença.....	154
Tabela 148.	Modelo de Cox univariado da proteína p16: óbito geral.....	156
Tabela 149.	Modelo de Cox da proteína p16 ajustada pelo sexo e idade.....	157
Tabela 150.	Modelo de Cox univariado da proteína p16: óbito pela doença...	159
Tabela 151.	Modelo de Cox da proteína p16 ajustada pelo sexo e idade.....	159
Tabela 152.	Relação das proteínas p53 e/ou p16 com a localização.....	160
Tabela 153.	Relação das proteínas p53 e/ou p16 com o estadiamento.....	160
Tabela 154.	Relação das proteínas p53 e/ou p16 com o tumor (T).....	160
Tabela 155.	Relação das proteínas p53 e/ou p16 com a disseminação linfonodal.....	161
Tabela 156.	Relação das proteínas p53 e/ou p16 com o linfonodo (N).....	161
Tabela 157.	Relação das proteínas p53 e/ou p16 com a recidiva.....	161
Tabela 158.	Relação das proteínas p53 e/ou p16 com o óbito geral.....	162
Tabela 159.	Relação das proteínas p53 e/ou p16 com o óbito pela doença....	162

## Lista de Siglas, Abreviaturas e Símbolos

AJCC	American Joint Committee on Cancer
Arg 72Pro	Transcrição Arginina para prolina no códon 72 no gene p53
Bcl-1	Protooncogene
Bcl-2	Célula-B de linfoma 2: proteína oncogênica que inibe apoptose
CDK	Quinase dependente de ciclina
CEC	Carcinoma Espinocelular
Ciclina D1	proteína codificada pelo gene CCND1 localizado no cromossomo 11q <sup>13</sup> : (complexos CDK4, CDK6, Quinase dependente de ciclina: protooncogene )
DNA	Ácido desoxinucleotideo
DRGE	Doença do Refluxo Gastro Esofágico
E1B	Vírus Epstein -Barr
E2F	Proteína-Elemento de transcrição
E6, E7	Oncoproteínas
E6IRNA <sub>m</sub>	Fator de transcrição do RNA com a oncoproteína-HPV
EGFR	Oncogene-Gene do fator de crescimento epidermal
G1	Fase do ciclo celular na interfase: grande produção de síntese proteica
G2	Término da duplicação do DNA e início da mitose
Gene 9p21	Local do mapeamento da proteína p16
Gene17p13	Local de mapeamento da proteína p53
H.E.	Hematoxilina e eosina
H.R.	Índice relativo
HPV	Papillomavirus Humano
hrHPV	Vírus do HPV
HUSM	Hospital Universitário de Santa Maria no Rio Grande do Sul
KI-67 ou MKI67	Antígeno, uma proteína codificada pelo gene MKI67, marcador de proliferação celular
MDM2	Gene Murine Double Minute-2
p53	Proteína produto do gene TP53 no cromossoma no 17p13
P16	Gene supressor tumoral

p16	proteína codificada gene CDKN2A - no cromossoma 9p21
p16INK4a	Proteína supressora tumoral codificada pelo códon CDKN2: a gene P16 é igual a p16
P27	Gene supressor tumoral
p53 Arg72Pro e p73 G4C14-to-A4T14 e exon 2 (G4A): aminoácidos nos genes (cromossomas)	
PCNA	Antígeno nuclear de proliferação celular
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pRb	Proteína do retinoblastoma
QT	Quimioterapia
RNAm	Ácido ribonucleotídeo mensageiro
RS	Rio Grande do Sul
RT	Radioterapia
S: Síntese	Duplicação do DNA duplicação dos centríolos ocorre na interfase
SM	Santa Maria
TNM	T=Tumor primário, N=linfonodo, M=Metástase
TP53	Gene supressor tumoral
UFMS	Universidade Federal de Santa Maria no Rio Grande do Sul
UICC	União Internacional de Controle do Câncer

## Resumo

**Objetivos:** Verificar a expressividade das proteínas p53 e/ou p16, nos pacientes com carcinoma de células escamosas nos sítios da cavidade oral, laringe e faringe. Relacionar a expressividade das proteínas p53 e/ou p16 com o estadiamento, a disseminação linfonodal e a sobrevida. Verificar se as proteínas p53 e/ou p16 possuem aspecto de risco ou proteção nesses pacientes e a sua relevância com o sítio primário. **Método:** A análise da expressividade das proteínas p53 e/ou p16 foi feita pela imunohistoquímica, por meio de um sistema automatizado através do Equipamento Benchmark GX Ventana (Alemanha). O material neoplásico utilizado foi oriundo de biópsias ou espécimes cirúrgicos com diagnóstico confirmado de carcinoma espinocelular da cavidade oral, laringe e faringe, de pacientes diagnosticados e tratados no Hospital Universitário de Santa Maria-RS-Brasil, no período de janeiro de 2014 a janeiro de 2018. É um estudo prospectivo observacional longitudinal. Na metodologia estatística foi utilizada o teste Qui-quadrado, teste de Wilcoxon, estimador de Kaplan-Meier(sobrevida)Cox univariado (ocorrência de óbitos) e o teste estimado de Log-rank (comparação entre as curvas de sobrevida). O nível de significância adotado é de 5%. **Resultados:** Na cavidade oral, a expressividade da proteína p53 foi de 69,6% e a proteína p16 foi de 30,4%. Na proteína p53, o nível C foi o mais expresso em 40,6% e a proteína p16 foi o grau 0 em 69,6%. Os pacientes com a proteína p53 positiva encontravam-se em estádios III e IV (56,3%). Os pacientes com a proteína p53 tiveram 2,8 vezes mais chances de evolução para óbito pela doença. A proteína p16 teve a menor expressão na língua e/ou soalho oral ( $p=0,014$ ). Maior número de óbitos pela doença aconteceu com os pacientes com a proteína p16 grau 0. Pacientes com a proteína p16 possuíam 0,6 vezes mais chances de óbito pela doença. Na laringe, a expressividade das proteínas p53 e p16 foi de 57% e 29,1%, respectivamente. Houve maior número de estádios III e IV com a proteína p53. Os pacientes com a proteína p53 tinham 2,5 vezes mais chances de evolução para óbito pela doença. Pacientes com a proteína p16 possuíam 1,17 vezes mais chances de óbito pela doença. Na faringe, a expressividade da proteína p53 e da proteína p16 foi de 57,1% e 34,1%, respectivamente. A maioria dos pacientes encontravam-se em estágio III e IV. Pacientes com a proteína p53 possuíam 1,17 vezes mais chances de evolução para óbito pela doença. A proteína p16 teve a sua maior expressão nos tumores T1( $p=0.046$ ). A proteína p16 isolada foi mais frequente na orofaringe em 9(90%) casos. Pacientes com a proteína p16 possuíam 0,83 vezes mais chances de evolução para óbito pela doença. Não houve relação direta com a disseminação linfonodal, porém na sua ausência ocorreram mais metástases linfonodais. **Conclusão:** A proteína p53 teve a sua maior expressividade em todos os sítios, com maior frequência nos estádios III e IV. Não teve relação com a disseminação linfonodal. É uma proteína de risco no carcinoma espinocelular de todos os sítios, sendo mais intenso na cavidade oral e laringe e menor na faringe. A proteína p16 teve a sua maior expressividade na orofaringe. É uma proteína com aspecto de proteção, especialmente na orofaringe e cavidade oral. Na laringe e hipofaringe não se reproduziu esse perfil. A relevância das proteínas p53 e p16 na sobrevida, esteve diretamente relacionada ao sítio primário da neoplasia.

Palavras-chave: Proteína p53, proteína p16, carcinoma, cavidade oral, laringe, faringe

## Abstract

**Objectives:** To verify the expressiveness of p53 and/or p16 proteins in patients with squamous cell carcinoma in the oral cavity, larynx and pharynx sites. To relate the expressiveness of proteins p53 and/or p16 with staging, lymph node dissemination and survival. To verify whether p53 and/or p16 proteins have a risk or protection aspect in these patients and their relevance to the primary site. **Method:** The analysis of the expressiveness of p53 and/or p16 proteins was made by immunohistochemistry, by means of an automated system using the Benchmark GX Ventana (Germany) equipment. The neoplastic material used was derived from biopsies or surgical specimens with a confirmed diagnosis of SCC of the oral cavity, larynx and pharynx, of patients diagnosed and treated at the Santa Maria University Hospital in Rio Grande do Sul-Brazil, in the period of January 2014 to January 2018. It is a prospective longitudinal observational study. **Statistical Methodology:** The Chi-Q test, Wilcoxon test, Kaplan-Meier Estimator (Survival) Cox univariate (occurrence of deaths) and the estimated Log-rank test (comparison between survival curves) were used. The level of significance adopted is 5%. **Results: In the oral cavity,** the expressiveness of the p53 protein was 69.6% and the p16 protein was 30.4%. In p53 protein, level C was the most expressed in 40.6% and the p16 protein was grade 0 in 69.6%. Patients with positive p53 protein were in stages III and IV (56.3%). Patients with p53 protein had 2.8 times more chances of progression to death from the disease. The p16 protein had the smallest expression in the tongue and/or oral floor ( $p = 0.014$ ). The highest number of deaths caused by the disease occurred with the patients with the p16 grade 0 protein. Patients with the p16 protein had 0.6 times more chances of death due to the disease. **In the larynx,** the expressiveness of proteins p53 and p16 was 57% and 29.1%, respectively. There was a higher number of stages III and IV with the p53 protein. The patients with the p53 protein had 2.5 times more chances of evolution to death by the disease. Patients with the p16 protein had 1.17 times more chances of death from the disease. **In the pharynx,** the expressiveness of p53 protein and p16 protein was 57.1% and 34, 1%, respectively. Most patients were in stage III and IV. Patients with p53 protein had 1.17 times more chances of progression to death from the disease. The p16 protein had its highest expression in T1 tumors ( $p = 0.046$ ). The isolated p16 protein was more frequent in the oropharynx in 9 (90%) cases. Patients with the p16 protein had 0.83 times more chances of progression to death from the disease. There was no direct relationship with lymph node dissemination, but in its absence, there were more lymphnode metastases. **Conclusion:** The p53 protein had its highest expressiveness in all sites, with higher frequency in stages III and IV. It was unrelated to lymph node dissemination. It is a risk protein in squamous cell carcinoma of all sites, being more intense in the oral cavity and larynx and lower in the pharynx. The p16 protein had its highest expressiveness in the oropharynx. It is a protein with protective aspect, especially in the oropharynx and oral cavity. The larynx and hypopharynx did not reproduce this profile. The relevance of proteins p53 and p16 in survival was directly related to the primary site of the neoplasm.

**Keywords:** p53 protein, p16 protein, carcinoma, oral cavity, larynx, pharynx



## ***1. Introdução***

---

## 1. INTRODUÇÃO

O câncer de Cabeça e Pescoço corresponde a 3% de todas as neoplasias malignas. Ao abordar o tema, a referência é o carcinoma de células escamosas nos sítios da cavidade oral, laringe e faringe. Sua maior frequência é no gênero masculino, com o aumento da incidência a partir dos 40 anos. Frequentemente, o diagnóstico é realizado com a idade média de 60 anos. O comportamento e a frequência do carcinoma de células escamosas na cavidade oral, laringe e faringe é diferente, apesar de ter os mesmos fatores predisponentes comuns: o tabagismo e o etilismo (Ruiz et al., 2006; Alvarenga et al., 2008; Colombo e Rahal, 2009). Outro fator de risco importante e crescente é a infecção por HPV. Os HPVs tipos 16 e 18 são relacionados ao carcinoma de células escamosas na orofaringe, especialmente na amígdala. Nos países ocidentais, o carcinoma de orofaringe por HPV tem se mostrado com uma associação maior que 30%. A apresentação mais comum prevalece em jovens, não fumantes, com evolução e prognóstico favoráveis (Ruiz et al., 2006).

Fatores de risco de menor prevalência que podem contribuir são a exposição a poluentes e a herança genética. Como cofatores, ressaltam-se a má nutrição, higiene oral precária, dieta pobre em nutrientes vegetais, deficiências em vitaminas A, C, e hábitos como o betel na Índia e o chimarrão no Sul do Brasil, Argentina e Uruguai (Goldenberg, Golz e Joachims, 2003; Chen et al., 2014). O tipo histológico mais frequente é o carcinoma de células escamosas, em mais de 90% dos casos, com a ocorrência aproximada de 40% na cavidade oral, 15% na faringe e 25% na laringe (Ruiz et al., 2006; Colombo e Rahal, 2009).

Nos últimos 25 anos de pesquisa houve um declínio da incidência do carcinoma de células escamosas na cavidade oral, laringe e faringe nos Estados Unidos da América (EUA), porém a mortalidade permaneceu considerável. A sobrevida geral é de 58% para brancos e 34% para negros com o carcinoma de células escamosas na cavidade oral e faringe. E para o carcinoma de células escamosas na laringe, a sobrevida é de 66% para brancos e 53% para negros, no período de 5 anos (Geisler et al., 2002). Embora haja um leve aumento de sobrevida comparado aos estudos do século passado, não houve diferença significativa nos resultados, apesar dos avanços médicos (Geisler et al., 2002).

Na Índia, a frequência do carcinoma de células escamosas é acima de 25% nos homens e acima de 10% nas mulheres. A base do tratamento é a radioterapia e

a quimioterapia concomitantes, e o índice de sobrevida em 5 anos é de 30% (Sathyamurthy et al., 2016).

As mais altas taxas do carcinoma de células escamosas na cavidade oral, laringe e faringe encontradas na América Central e Sul pertencem ao Brasil, Argentina, Cuba, Guiana Francesa e o Uruguai (Perdomo et al., 2016). O Brasil possui a maior incidência e mortalidade por carcinoma de células escamosas na cavidade oral e na faringe, para ambos os gêneros masculino e feminino, seguido do Uruguai e de Cuba (Perdomo et al., 2016). De acordo com os mesmos autores, o carcinoma de células escamosas na laringe tem a sua maior incidência e mortalidade em Cuba, seguido do Brasil, Uruguai e Argentina. Os fatores de risco de maior importância, na população desses países, são o tabagismo e o etilismo. Apesar das campanhas educativas e preventivas contra o tabagismo e o etilismo, permanecem altas as cifras de mortalidade em diferentes regiões da América Central e Sul. A respeito do carcinoma de células escamosas na orofaringe, relacionado ao HPV, ainda é baixa a incidência, comparado aos países da Europa e o Estados Unidos (Perdomo et al., 2016).

No Brasil, as estimativas para o biênio 2018-2019 são de 6.390 casos novos de carcinoma na laringe para homens e 1.280 casos novos para mulheres a cada ano. A estimativa será de 6,17 casos a cada 100 mil homens, ocupando a oitava posição; e a décima sexta posição com 1,20 casos a cada 100 mil mulheres. Na cavidade oral, a perspectiva é de 11.200 casos novos de carcinoma para homens e 3.500 casos novos para mulheres a cada ano, para esse mesmo biênio.

Esses valores correspondem a um risco estimado de 10,86 casos novos a cada 100 mil homens, ocupando a quinta posição; e de 3,28 para cada 100 mil mulheres, sendo o décimo segundo mais frequente nas mulheres entre todos os cânceres (Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2018).

Na faringe, a incidência geral do carcinoma na orofaringe é de 8 a 10 casos novos para cada 100.000 pessoas, mas varia de acordo com a região (Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2018).

### **1.1 O processo da carcinogênese**

O equilíbrio entre a proliferação e a morte celular determina a integridade estrutural e funcional dos tecidos. Esse equilíbrio é mantido por um complexo de ações

intra e extracelulares (Ferreira e Rocha, 2010). Quando ocorre a perda dessa homeostase celular desencadeia-se uma proliferação desordenada e anômala de células que irão constituir um grupo de células novas que, sem a devida regulação, desenvolverão um tumor primário (Ferreira e Rocha, 2010). A partir desse momento, células desse tumor invadirão a membrana basal do tecido de origem por meio de enzimas proteolíticas, atingindo vasos sanguíneos, disseminando-se em outros tecidos com novas formações celulares desorganizadas e independentes: as metástases (Ferreira e Rocha, 2010). A perda do controle proliferativo e aquisição de caracteres sem a autorregulação são consequências de alterações genéticas ocorridas nas células normais. Após adquirir uma maior capacidade de proliferação, a célula mutante sofre uma expansão clonal em relação às células adjacentes, reproduzindo todas as alterações genéticas para as células que dela própria se originaram (Ferreira e Rocha, 2010).

## **1.2 Produção de Proteínas – Marcadores**

No processo da carcinogênese há produção de certas proteínas que são verdadeiros marcadores. Essas são produtos de transformações genéticas específicas, muitas vezes consequentes à replicação desordenada dos genes. O seu acúmulo pode corresponder a fases diferentes de um provável desenvolvimento neoplásico (Ferreira e Rocha, 2010). Essas proteínas podem estar presentes em diferentes tumores. A detecção das mesmas pode ser analisada pelos seus níveis de expressividade.

A identificação dessas proteínas pode nos fornecer informações significativas a respeito do comprometimento neoplásico, como a invasão local, disseminação linfonodal, a distância ou um segundo tumor primário (Ferreira e Rocha, 2010). Conforme a origem de determinadas neoplasias, a presença ou a ausência desses marcadores pode sinalizar diferentes prognósticos no tempo livre da doença ou na sobrevivência. Outrossim é importante verificar a relação do grau de expressividade do marcador com o sítio primário da neoplasia (Ferreira e Rocha, 2010).

### 1.2.1 Relação dos Marcadores com o Câncer de Cabeça e Pescoço

O carcinoma de células escamosas da cavidade oral, laringe e faringe está associado à significativa proporção de morbimortalidade. É considerado como uma única entidade histopatológica, porém distinta quanto ao padrão de crescimento, comportamento clínico e o prognóstico quando acomete as diferentes localizações anatômicas (Ruiz et al. 2006; Ferreira e Rocha, 2010). O carcinoma de células escamosas da cavidade oral, laringe e faringe apresenta diferenças importantes devido às alterações genéticas e cromossômicas no comportamento clínico e biológico (Ruiz et al., 2006; Colombo e Rahal, 2009; Ferreira e Rocha, 2010). Essas modificações nem sempre são identificadas, assim como o momento da inter-relação entre elas, no processo da doença.

A evidência clínica frente a estádios mais avançados pode estabelecer um prognóstico desfavorável, além de um padrão heterogêneo como, por exemplo, o tamanho do tumor primário, presença de metástase linfonodal, margens cirúrgicas comprometidas e a invasão perineural (Ferreira e Rocha, 2010). A extensão extra capsular na metástase linfonodal permanece o indicador patológico de prognóstico mais relevante na sobrevida. As melhores respostas são de 50% na sobrevida, aproximadamente, para todas as situações de estadiamento, todos os sítios e subsítios da cavidade oral, laringe e faringe com tratamento multidisciplinar, seja com a cirurgia associada à radioterapia e/ou quimioterapia, ou diretamente com o protocolo clínico de preservação de órgãos (Ferreira e Rocha, 2010).

Existem poucos estudos em relação a marcadores prognósticos para o carcinoma de células escamosas na cavidade oral, laringe e na faringe. Ainda não temos marcadores específicos que possam estratificar o tratamento mais adequado, de acordo com a presença dos mesmos nos tumores. (Ferreira e Rocha, 2010).

No carcinoma de células escamosas da cabeça e pescoço, vários marcadores isolados ou associados têm sido estudados na gênese do tumor, entre eles, destacamos as proteínas p53 e p16 na cavidade oral, laringe e faringe (Ferreira e Rocha, 2010). O gene *TP53* (*tumor protein p53*), mapeado em 17p13, está presente em muitas funções celulares, iniciando pela manutenção da estabilidade genômica, além da progressão do ciclo celular, diferenciação celular, reparo a danos no DNA e a apoptose. Em resposta aos danos no DNA da célula, a produção da proteína aumenta e induz a parada do ciclo celular na transição G1/S. Se o dano não for

reparado, o p53 leva a célula à apoptose. Na presença de mutações deste gene, o produto gênico é frequentemente presente em altas concentrações (Lane e Crawford, 1979; Patel et al., 2018). No carcinoma de células escamosas da cabeça e pescoço são relatadas mutações de 33% a 59% dos casos. A expressividade elevada da proteína p53 nos tumores primários é considerada um sinal preditivo de sobrevida reduzida em função da sua associação com a recidiva de tumores primários e/ou surgimento de novos tumores primários (Fett-Contee Sallae, 2002; Ruiz et al., 2006; Colombo e Rahal, 2009; Luken, Conde e Carnero, 2016;).

A proteína p16, codificada pelo gene supressor de tumor *CDKN2A* (*Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*), localizado em 9p21, pertence à família dos inibidores de quinase, dependentes de ciclina, que incluem as proteínas p15, p21 e p27. Esses genes regulam a fase G1 do ciclo celular de forma negativa. A proteína p16, ao ligar-se ao CDK4 (*cyclin-dependent kinase-4*) e ao CDK6 (*cyclin-dependent kinase-6*), inibe a associação com a ciclina D1. A inibição das funções do complexo ciclina D1/CDK4/6 interrompe a fosforilação da proteína Rb e a liberação do fator de transcrição E2F, propiciando a inibição do ciclo celular na fase de transição G1-S. Alterações genéticas na proteína p16 podem contribuir com o crescimento celular, promovendo o processo neoplásico.

Determinados estudos mostram que a proteína p16 alterada ou diminuída está associada à baixa sobrevida, aumento das recidivas, progressão da doença e maior número de metástases linfonodais (Bova et al., 1999; Yuen et al., 2002; Ruiz et al., 2006; Colombo e Rahal, 2009; Settle et al 2009a, Settle et al., 2009b; Britto, Paula e Saddi. 2014).

O interesse sobre esses marcadores surge na expectativa da ação dos mesmos no prognóstico dos pacientes com carcinoma de células escamosas, na cavidade oral, laringe e faringe. Assim, num futuro profícuo, poderemos planejar o tratamento mais adequado para os pacientes, com terapias alvos, atingindo a doença com maior especificidade, menos efeitos colaterais e melhor sobrevida, baseados em evidências clínicas e moleculares (Perri et al., 2015; Solomon, Young e Rischin, 2018).

A pesquisa da expressividade das proteínas é estratificar os tumores nos seus principais sítios de localização, estadiamento, disseminação linfonodal e na sobrevida (Karpathiou et al., 2016). O aumento da sobrevida, as maiores chances de preservação anátomo-funcional dos órgãos e a qualidade de vida são os grandes desafios do tratamento atual. Todas essas considerações instigam a conhecer as

reais funções das proteínas p53 e p16 no desenvolvimento do carcinoma de células escamosas na cavidade oral, laringe e faringe (Geisler et al., 2002; Colombo e Rahal, 2009; Ferreira e Rocha, 2010; Karpathiou et al., 2016).

O tratamento do carcinoma de células escamosas da cabeça e pescoço, especialmente na cavidade oral, laringe e faringe, muitas vezes é complexo, com resultados frustrantes e inerentes ao comportamento biológico da doença (Ruiz et al., 2006). Apesar das abordagens agressivas e multidisciplinares do tratamento, o índice de sobrevivência em cinco anos permanece inalterado nos últimos 40 anos, e apenas 30% a 40% dos pacientes atingem tal índice (Ruiz et al., 2006; Colombo e Rahal, 2009; Ferreira e Rocha, 2010).

Portanto questões importantes precisam ser elucidadas como:

- O grau de expressividade das proteínas p53 e p16 isoladas ou associadas será relevante, considerando o sítio primário do carcinoma de células escamosas?
- O grau de expressividade das proteínas p53 e p16 isoladas ou associadas poderá ser um “identificador” de uma doença mais avançada com comprometimento linfonodal?
- O grau de expressividade das proteínas p53 e p16 isoladas ou associadas poderá ser um “padrão de risco ou de proteção” na sobrevida, dos pacientes com o carcinoma de células escamosas na cavidade oral, laringe e faringe?

Vários autores mostraram as principais diferenças entre as proteínas p53 e p16, considerando os fatores de risco, estadiamento, sítio e subsítios primário da neoplasia, resposta ao tratamento e a recidiva da doença (Geisler et al., 2002; Broglie et al., 2013; Shinohara et al., 2014; Karpathiou et al., 2016; Rasmussen et al., 2017). A hiper expressividade do p53 está mais associada aos pacientes tabagistas e etilistas, com tumores mais resistentes à radioterapia e estádios avançados (Spafford et al., 1996; Jin et al., 1998; Pruner, Pignataro e Carboni, 1998; Jackel et al., 2000; Geisler et al., 2002; Kumar et al., 2008; Sarafoleanu et al., 2009; Broglie et al., 2013, Yang et al., 2014). Todavia, há pesquisadores que obtiveram melhor prognóstico através de uma resposta favorável ao tratamento, com a hiper expressividade da proteína p53 (Hirvikoski et al., 1997; Parise Jr. et al., 2004; Sathiyamurthy et al., 2016), enquanto outros não definiram nenhuma relevância quanto à expressividade da proteína p53 (Nadal et al 1995; Friedman et al., 2001; Rodrigues et al., 2008). Apesar das controvérsias desses resultados, a proteína p53 tem um papel fundamental na

compreensão da gênese de inúmeros tumores (Tandon et al., 2010; Almangush et al., 2017; Patel et al., 2018).

Os tumores com uma expressividade maior da proteína p16 são provavelmente relacionados à infecção por HPV, particularmente o tipo HPV-16. A sua localização mais frequente é a orofaringe, em especial na amígdala, e confere um melhor prognóstico (Syrjänen et al., 1983).

Karpathiou et al. (2016), ao investigarem o HPV-16 como fator de risco no carcinoma de células escamosas da cabeça e pescoço, estudaram a expressividade da proteína p16. Os autores concluíram que a análise da proteína p16 através da imunohistoquímica é o primeiro método efetivo, com significativa concordância com o DNA do HPV, além de ser de baixo custo (Karpathiou et al., 2016). Nesse trabalho a concordância da expressividade da proteína p16 com o DNA do HPV foi altamente significativa ( $k=0.8$ ), na orofaringe. Entretanto, houve pouca correspondência para outros sítios não orofaringe. A expressividade da proteína p16 obteve uma sensibilidade de 52% e uma especificidade de 93% (Karpathiou et al., 2016).

Os pacientes cujos tumores possuem uma expressividade maior da proteína p16, são geralmente indivíduos mais jovens, não tabagistas e não etilistas. A localização primária e principal é a orofaringe e, independente da doença linfonodal avançada, a resposta ao tratamento é muito favorável (Reimers et al., 2007; Fakhry et al., 2008; Ang et al., 2010; Stephen et al., 2013; Britto, Paula e Saddi, 2014; Fakhry et al., 2017). Em contrapartida, a ausência da proteína p16 ou a identificação de mutações na proteína traduz uma piora da sobrevida, na orofaringe. Nos demais sítios anatômicos a presença da proteína p16 parece ter pouco significado como fator protetor, sem alterar efetivamente a sobrevida (Bova et al., 1999; Yuen et al., 2002; Schrank et al., 2011; Broglie et al., 2013; Sathymurthy et al., 2016).

Pacientes com carcinoma de células escamosas na orofaringe ou hipofaringe, onde se observam uma hiper expressividade ou mutação de um ou de ambas proteínas, têm revelado diferenças importantes na resposta ao tratamento e no prognóstico. As evidências de maior número de recidivas e óbitos destacam-se na hiper expressividade da proteína p53, na ausência da proteína p16 ou, particularmente, na identificação de mutações da própria proteína p16 (Geisler et al., 2002; Ernoux-Neufcoeur et al., 2011; Broglie et al., 2013; Shinohara et al., 2014).

Baseado no estudo de vários autores, é interessante e fundamental que se verifique “o perfil de risco ou de proteção” das proteínas p53 e p16 como marcadores



nos pacientes portadores do carcinoma de células escamosas na cavidade oral, laringe e faringe.

### 1.3 Revisão da Literatura

Os marcadores p53 e o p16, envolvidos na regulação do ciclo celular, foram descritos em tempos diferentes da história da biologia molecular.

#### 1.3.1 A proteína p53

A proteína p53 teve as suas primeiras descrições nos tumores de cólon. O seu estudo desenvolveu-se a partir do mapeamento do gene 17p13.1 nas células transformadas pelo vírus SV40, em 1979 (Lane e Crawford, 1979). A codificação da proteína p53 ocorreu durante a associação dessas células com o antígeno T, descobrindo na própria proteína um alvo para outros vírus, HPV16, HPV18 e E1B. Os danos ocorridos num gene desencadeavam ativação de outros genes, cujo produto proteico inibia a quinase dependente da ciclina, bloqueando a inativação de pRb pelo CDK4. Esses eventos geravam a parada do ciclo celular na fase G1, antes da duplicação do DNA (S), permitindo o reparo do DNA danificado. Na irreversibilidade do reparo ao DNA, a proteína p53 desenvolvia a morte programada, a apoptose, além do *check point* de S para G2 (Gao e Zelenka, 1997; Weinert, 1998). Uma situação de grande relevância foi a descoberta do seu efeito negativo dominante, na presença de algumas mutações, nas quais o produto de um único alelo alterado interage e inativa o seu alelo normal, transformando a ação supressora tumoral em atividade oncogênica e, como consequência, a indução do câncer (Levine, 1997).

No mesmo estudo ficou evidente a baixa concentração da proteína p53 nas células normais, com uma meia vida curta, de aproximadamente 20 minutos. Na presença de mutações nos éxons 5-8 ou 5-9 do TP53, a concentração das proteínas aumenta acentuadamente. Desde então essas mutações têm sido identificadas em 60% dos casos dos cânceres em cabeça e pescoço (Ruiz et al., 2006; Colombo e Rahal, 2009; Luken, Conde e Carnero, 2016; Wang et al., 2016).

Ficou assim, evidente a suscetibilidade do gene TP53 e o seu conteúdo a fatores externos, culminando em danos e transformações no seu DNA. Com o

descobrimiento das mutações foi possível compreender a predisposição neoplásica das células somáticas e germinativas. Entre as células somáticas destacaram-se as várias neoplasias da cabeça e pescoço, pulmão, fígado, intestino, mama, leucemias, linfomas, supra renal, adenocarcinomas, rim e pele.

Outra característica importante atribuída ao p53 após a mutação foi a resistência à radioterapia e aos quimioterápicos, observada principalmente nos tumores sólidos da cabeça e pescoço, pulmão, intestino e mama. A evidência da hiperexpressividade da proteína p53 nessas neoplasias sugeriu um prognóstico reservado (Fett-Conte e Sallae, 2002; Ruiz et al., 2006; Colombo e Rahal, 2009; Broglie et al., 2013).

Apesar das mutações do P53 serem observadas principalmente nas células somáticas, também foram descritas em células germinativas como na Síndrome de Li-Fraumeni, denominada como uma síndrome rara de câncer hereditário com padrão de herança autossômica dominante. As suas principais descrições foram a predisposição ao tumor cerebral, a sarcomas, leucemias, ao carcinoma adrenocortical nas crianças e nos adultos jovens. O P53 que sofreu mutações foi identificado em 75% das famílias, cujos portadores apresentaram um aumento dos níveis da proteína p53 nos tecidos normais e neoplásicos. A expressividade da proteína p53 tem sido sugerida na investigação dos tumores de cabeça e pescoço, pulmão e cólon com as predisposições familiares. Por todas essas razões, justificou-se ao P53 o título de “Guardião do genoma” (Fett-Conte e Sallae, 2002; Ruiz et al., 2006; Colombo e Rahal, 2009).

Patel et al., (2018) destacaram muito bem as mutações sofridas no DNA celular do P53, cujo papel central tem sido a prevenção de um fenótipo maligno a partir de uma célula normal. As mutações como a perda da heterozigose e as deleções no P53 foram as principais causas de defeitos nas funções normais da proteína p53, e presentes na maioria dos cânceres humanos. Entretanto, os tumores que apresentaram essas alterações na regulação do P53 abrigaram o tipo selvagem do p53. Portanto, o entendimento da perda da atividade supressora tumoral tem sido crucial para conhecer esses tumores de linhagem agressiva e selvagem.

O polimorfismo da linha germinativa da proteína p53 tem sido avaliado também como causa de distúrbios mensuráveis nas funções desse marcador. Estudos de revisão têm atribuído ao p53 a função de mediador de resposta celular aos vários danos sobre o DNA, alterando respostas à terapia do câncer, significativamente à

apoptose (Patel et al., 2018). Diversos autores evidenciaram que os pacientes com alta expressividade da proteína p53 adquiriram importantes alterações genômicas, nas quais refletiram doenças mais agressivas nos carcinomas de células escamosas da cabeça e pescoço, e encontraram-se mais relacionadas ao tabagismo e ao etilismo Ruiz et al., 2006; Colombo e Rahal, 2009; Chen et al., 2014; Luken, Conde e Carnero, 2016; Ottria et al., 2018).

#### 1.3.1.1 A proteína p 53 e a relação com lesões precursoras do Câncer

Nadal et al., (1995) analisaram a expressividade da proteína p53 em 89 amostras de carcinomas de células escamosas na laringe de pacientes tratados por cirurgia e 60 amostras de tecido epitelial respiratório normal e lesões não invasivas na laringe. A imunoreatividade da proteína p53 foi observada em 57 amostras dos carcinomas de células escamosas (64%). Nenhuma das oito amostras do tecido epitelial respiratório normal foi positiva para a proteína p53. Células com a proteína p53 positiva foram observadas em oito das vinte e três amostras com metaplasias de células escamosas (35%), seis das 19 amostras com displasia leve (32%) e cinco das 10 amostras com displasias de alto grau (50%). Não foram encontrados correlação entre a expressividade da proteína p53 e os achados clínicos e patológicos nos carcinomas (Nadal et al., 1995). Também não houve diferença entre a sobrevida e o tempo livre de doença entre os pacientes com a proteína p 53 positiva e a proteína p53 negativa. Nesse estudo, os achados mostraram que a proteína p53 tem relação direta nos estágios iniciais da transformação maligna, porém sem a associação com a progressão da doença (Nadal et al., 1995).

Binato (2007) mostrou a importância da expressividade da proteína p53 nas lesões decorrentes da Doença do Refluxo Gastroesofágico (DRGE) no esôfago, sendo lesões com grande potencial para transformação metaplásicas, displásicas e neoplásicas a partir do epitélio normal estratificado não queratinizante. O autor concluiu que as alterações moleculares mediadas pela expressividade da proteína p53 foram progressivamente maiores quanto pior a alteração histológica decorrente da DRGE. A positividade da proteína p53 foi documentada em 62.5% dos pacientes com epitélio colunar com metaplasia intestinal, e em 71.4% entre aqueles com adenocarcinoma (Binato, 2007). A conclusão desse estudo foi a correlação positiva entre o aumento da expressividade da proteína p53 e a piora histológica. Segundo o

autor, é grande a possibilidade dos mesmos mecanismos de lesão que produziram aumento da atividade proliferativa serem os mesmos que produziram alterações moleculares que levaram ao câncer (Binato, 2007).

Bloching et al. (2008) realizaram a titulação da proteína p53 num grupo da população alemã, dos quais foram coletadas amostras celulares da mucosa oral de tabagistas, consumidores de bebidas alcoólicas e de um grupo controle. O estudo foi comparativo entre os grupos de risco e o grupo controle. A experiência mostrou uma maior expressividade da proteína p53 na mucosa oral dos indivíduos expostos ao tabagismo e ao etilismo, podendo assim caracterizar zonas potenciais à cancerização (Bloching et al., 2008).

Galli et al. (2009) estudaram o polimorfismo genético das proteínas p53 e p73 entre dois grupos populacionais relacionados ao tabagismo. Foram compostos dois grupos, sendo um grupo de risco para o carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, particularmente na cavidade oral, e outro grupo controle. Foram estudados os genótipos P53 no éxon 4 (Arg 72Pro), intron 3 e 6 e o P73 éxon2 G4C14 para A4T14. Esse estudo identificou o risco para carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço reproduzidos para as proteínas, através da combinação do p73 éxon 2 (G4C14 para A4T14) e o p53 intron 3 variante alelo; e proteção para as variantes dos alelos p53 éxon 4 e p53 intron 6 (Galli et al., 2009).

Mondal et al. (2013) detectaram o aumento da expressividade da proteína p53 na progressão de vários graus da displasia e no carcinoma de células escamosas de 62 amostras de tecidos laríngeos com lesões pré-invasivas e invasivas de pacientes, sendo a maioria tabagistas (Mondal et al., 2013).

Patel et al. (2018) enfatizaram a importância dos níveis da expressividade da proteína p53 na carcinogênese da cavidade oral. Tanto a hiper expressividade da proteína p53 como o polimorfismo do MDM2 mostraram os efeitos no desenvolvimento do carcinoma. A atenuação da resposta da proteína p53 na carcinogênese oral foi sugerida a partir da degradação do P53 pelas oncoproteínas E6 de alto risco. Essas respostas têm sido implicadas na habilidade do indivíduo responder às terapias para o câncer. Logo à compreensão do mecanismo pelo qual a função normal do P53 foi prejudicada torna-se necessário a identificação das características do tumor, prognóstico e perspectivas futuras no tratamento do carcinoma oral (Patel et al., 2018).

Singla et al. (2018) também demonstraram a expressividade da proteína p53 correlacionando-a nas lesões pré-malignas e no câncer de cavidade oral. Eles estudaram 80 casos, sendo 40 casos de leucoplasia e 40 casos de carcinoma na cavidade oral. A expressividade da proteína p53 e do EGFR foi significativo ( $p < 0.001$ ) entre a leucoplasia, carcinoma de células escamosas e o grupo controle. A expressividade da proteína p53 e do EGFR mostrou-se evidente na menor diferenciação dos carcinomas de células escamosas. A proteína p53 e o EGFR foram confirmados como bio marcadores úteis para o diagnóstico de leucoplasia e para o risco de transformação maligna (Singla et al, 2018).

Zaid et al. (2018) analisaram a expressividade da proteína p53 nas amostras do carcinoma de células escamosas, lesões pré-malignas e mucosa oral normal, de pacientes tabagistas por shisha. A maioria das amostras com carcinoma de células escamosas (74.3%) mostrou coloração positiva da proteína p53 em 83.1% dos fumantes de shisha, e em 65.5% dos não-fumantes.

Nas 96 amostras das lesões pré-malignas, a positividade da proteína p53 mostrou-se em 23% dos não-fumantes e em 41.7% dos fumantes. No epitélio normal, a positividade da proteína p53 foi detectada em 6.6% dos não-fumantes e em 16.6% dos fumantes. A correlação positiva da proteína p53 com tabagismo por shisha ficou evidente nos seguintes grupos: carcinoma de células escamosas bem diferenciado, carcinoma escamoso moderadamente diferenciado, displasia leve G1, displasia moderada G2 e na mucosa oral (Zaid et al., 2018).

#### 1.3.1.1 Relação da expressividade da proteína p53 com o estadiamento, grau de diferenciação e prognóstico

##### 1.3.3.1.1 A proteína p 53 como marcador desfavorável

O aumento da expressividade da proteína p53 tem sido documentado principalmente no carcinoma de células escamosas da laringe. Tem maior caracterização nas apresentações mais infiltrativas e invasivas, como a doença loco regional avançada ao diagnóstico, cuja evolução manifesta-se desfavorável ao tratamento radioterápico, associado ou não à quimioterapia, com recidivas frequentes; ou quando tratados por cirurgia independente das margens cirúrgicas livres. (Spafford et al., 1996; Pruner, Pignataro e Carboni, 1998; Jackel et al., 2000; Geisler

et al., 2002; Kumar et al., 2008; Sarafoleanu et al., 2009; Yang et al., 2014; Almangush et al., 2017).

Com ênfase para o trabalho de Pruneri, Pignataro e Carboni (1998), que avaliaram a expressividade das proteínas p53 e bcl-2 em 149 pacientes portadores do carcinoma de células escamosas na laringe. A hiper expressividade da proteína p53 foi encontrada em 75 casos, e do bcl-2 em 39 casos. A expressividade das proteínas (marcadores) p53 e do bcl-2 associados foram encontradas em 21 casos. A associação positiva dessas proteínas mostrou maior compatibilidade com a indiferenciação neoplásica, extensão tumoral, tumores supra glóticos, metástases linfonodais e doença avançada (Pruneri, Pignataro e Carboni, 1998).

Houve uma maior significância estatística entre a expressividade do bcl-2 com tumores supra glóticos e extenso comprometimento neoplásico. Na análise univariada, a menor sobrevida estava associada ao p53/bcl-2. Porém, analisados separadamente, não houve a reprodução desses resultados. Na análise multivariada, somente os tumores supra glóticos e a extensão neoplásica possuíram valor prognóstico (Pruneri, Pignataro e Carboni, 1998).

Pukkila et al. (2002), ao estudarem 123 pacientes com carcinoma de células escamosas de orofaringe e hipofaringe entre 1973 a 1998, na Finlândia, observaram que a hiper expressividade da proteína p53 no núcleo celular eram correspondentes a uma maior indiferenciação e resultados desfavoráveis ao tratamento (Pukkila et al., 2002). Outros autores como Sarafoleanu et al., (2009) determinaram a importância da proteína p53 associada ao PCNA e o Ki-67 no grau de diferenciação do carcinoma epidermóide da laringe nos estádios avançados. Valores de p53 (20-60%), PCNA (60-80%) e de Ki-67 (> 40%) corresponderam a uma maior agressividade biológica. (Sarafoleanu et al., 2009)

#### 1.3.3.1.2 A proteína p 53 como marcador favorável

Hirvikoski et al. (1997) publicaram um estudo de 103 pacientes com carcinoma de células escamosas de laringe, tratados entre 1975 a 1990, onde a hiper expressividade da proteína p53 mostrou um melhor prognóstico na sobrevida geral e no tempo livre de doença. Os autores sugeriram a possibilidade da proteína p53 ser um marcador independente (Hirvikoski et al., 1997).

Ao estudarem 58 pacientes com carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço. Parise Jr. et al. (2004) verificaram a relevância da proteína p53 conforme o sítio acometido pelo tumor. A proteína p53 quando presente na hipofaringe parece mais favorável ao prognóstico. O mesmo foi sugerido para tumores de base de língua e para a laringe (Parise Jr. et al., 2004).

Sathyamurthy et al. (2016) trataram 25 casos de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço. Todos foram tratados por RT e cisplatina. Os marcadores foram avaliados por imunohistoquímica. A positividade da proteína p53 foi de 76%. Todos os 25 pacientes tiveram resposta completa em 52% (13), resposta parcial 28% (7), doença estável 12% (3) e 8% (2) mantinham doença progressiva. A positividade do p53 foi quase significativa para resposta completa ( $p=0.073$ ) (Sathyamurthy et al., 2016).

#### 1.3.3.1.3 proteína p53 sem relevância no prognóstico

Friedman et al. (2001) analisaram a hiper expressividade da proteína p53 em estádios avançados do carcinoma de células escamosas na laringe. A hiper expressividade da proteína p53 não mostrou correspondência com a sobrevida e nem com o tempo livre de doença. Os autores concluíram não haver evidencias suficientes para definir a proteína p53 como um marcador preditivo na sobrevida de pacientes com carcinoma na laringe (Friedman et al., 2001).

Rodrigues et al. (2008) estudaram 30 casos de carcinoma na laringe, com a expressividade das proteínas p53 e o Ki-67 relacionadas ao estágio e o grau histológico. A proteína p53 estava presente em 70% dos tumores de alto nível histológico. A patologia mostrou que no grupo avançado de carcinomas de células escamosas a expressividade da proteína p53 foi de 61.5%. Não houve diferenças significativas quanto ao estágio e o prognóstico com a proteína p53 (Rodrigues et al., 2008). A expressividade do Ki-67 mostrou-se positiva em 100% dos casos de tumores precoces, e nos casos de tumores avançados em 73.1%. Apenas pacientes com mais de 50 anos possuíam a expressividade do Ki-67 bem maior (Rodrigues et al., 2008).

Sinsek et al. (2014) evidenciaram a hiper expressividade da proteína p53 no início da carcinogênese da laringe. Todavia, sem consequências à progressão da doença (Sinsek et al., 2014).

Essa diversidade de resultados relacionado a proteína p53 na literatura tem inúmeras justificativas. Tandon et al. (2010) publicaram uma meta análise sobre o p53, enumerando as várias causas, como séries retrospectivas, número variado de amostras, poucos estudos prospectivos e avaliações estatísticas pouco significativas para determinados sítios, relacionados ao tratamento e ao prognóstico (Tandon et al., 2010; Almangush et al., 2017).

### **1.3.2 A proteína p16 e a relação HPV**

A proteína p16, codificada pelo gene supressor de tumor CDKN2A (Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A), localizado em 9p21, pertence à família dos inibidores de quinase dependentes de ciclina. A inibição da atividade do complexo ciclina D1/CDK4/6 leva à inibição do ciclo celular (G1-S). A proteína p16 guarda uma íntima relação com o HPV, particularmente o HPV 16, cuja correspondência maior é com o carcinoma de células escamosas na orofaringe (Syrjänen et al., 1983; Ruiz et al., 2006; Colombo e Rahal, 2009; Stephen et al., 2013; Britto, Paula e Saddi, 2014; Karpathiou et al., 2016; Ottria et al., 2018). Os pacientes com a expressividade acentuada da proteína p16 possuem um comportamento diferente daqueles com a expressividade negativa da proteína p16 (Syrjänen et al., 1983; Bova et al., 1999; Yuen et al., 2002).

Os primeiros estudos sobre uma neoplasia maligna de apresentação distinta na orofaringe com a proteína p16 ligada ao HPV foram desenvolvidos por Syrjanenk et al. (1983). A partir de então, muitos trabalhos têm revelado a associação do HPV nos carcinomas de orofaringe. O perfil descrito desses pacientes eram de indivíduos jovens, não fumantes, não etilistas, com proteína p16/HPV 16 positivos, que mostravam uma boa resposta à radioterapia e/ou quimioterapia, apesar da doença avançada. Na década de 1970, 23% dos trabalhos sobre carcinomas de células escamosas na orofaringe mostravam a sua origem na amígdala (Syrjänen et al., 1983).

Em uma revisão sistemática de 5046 pacientes com carcinoma de células escamosas, Kreimer et al. (2005) identificaram a prevalência do HPV em 25.9%. O maior percentual foi na orofaringe (35.6%), na cavidade oral (23,5%) e na laringe (24%) (Kreimer et al., 2005). Entre 2006 e 2007 havia 93% de positividade do HPV nos carcinomas de células escamosas na orofaringe, sendo considerado



praticamente um aspecto endêmico. Nos anos de 2008 a 2014 prevaleceram altas taxas de incidência, principalmente nos países ocidentais do primeiro mundo (Näsman et al., 2009; Marur et al., 2010; Nguyen et al., 2010; Cerezo et al., 2013).

Cerca de 25% dos casos de carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço relacionam-se ao HPV, conforme revisão sistemática realizada por Britto, Paula e Saddi (2014). O HPV mais detectado tem sido o tipo 16, presente em 90% a 95% dos casos, seguido pelos HPV 18, HPV 33 e o HPV 35. De acordo com autores, os HPV de alto risco (HPV 16 e 18) codificam duas importantes oncoproteínas virais, as E6 e E7. A proteína E7 do HPV 16, ao ligar-se à proteína do retinoblastoma (pRb), regula a transição G1/S do ciclo celular, inativando-a (Britto, Paula e Saddi, 2014), enquanto que a proteína E6 possui atividades oncogênicas por meio da imortalização das células primárias, transformação de linhagens celulares, resistência à diferenciação celular e a abolição do ponto de checagem do ciclo celular (Syrjänen et al., 1983; Ruiz et al., 2006; Britto, Paula e Saddi, 2014; Karpathiou et al., 2016).

A carcinogênese foi melhor esclarecida após a identificação das funções das oncoproteínas E6 e E7. A proteína p16 tem sido amplamente estudada nos carcinomas de cavidade oral e de orofaringe, particularmente como supressora tumoral, inibindo as quinases dependentes de ciclina (CDK4 e CDK6) que regulam o ponto G1 de checagem do ciclo celular.

A expressividade da proteína 16 tem sido menor no epitélio normal e muito mais intensa nas células proliferativas e lesões inflamatórias. Portanto, sua ação principal foi evidenciada no controle do ciclo celular, onde ocorre a parada do ciclo e a apoptose, interrompendo, assim, a proliferação pela manutenção de um estado de fosforilação da proteína do retinoblastoma.

A hiper expressividade da proteína p16 tem sido descrita em resposta à inativação da pRB durante a ação das oncoproteínas E7 do HPV (Ruiz et al., 2006; Colombo e Rahal, 2009; Britto, Paula e Saddi, 2014).

Em função disso a expressividade da proteína p16 tem sido melhor relacionada à proliferação celular dos carcinomas, particularmente da cavidade oral e da orofaringe (Ang et al 2010; Stephen et al., 2013; Britto, Paula e Saddi, 2014; Karpathiou et al., 2016).

Na revisão realizada por Britto, Paula e Saddi. (2014) ficou evidente que a baixa expressividade da proteína p16 estava associada à proliferação celular e ao tamanho do tumor, caracterizando um mau prognóstico, ao considerar a própria

proteína, como reguladora do ciclo celular. Por outro lado, a maioria dos estudos não avaliou a expressividade da proteína p16 em relação aos aspectos tumorais relevantes como a sobrevida dos pacientes e o estadiamento (Britto, Paula e Saddi, 2014).

Os tumores com a expressividade da proteína p16 ligada ao HPV têm sido referenciados como distintos dos tumores com a proteína p53 positiva. Os primeiros têm sua maior prevalência no carcinoma de células escamosas da orofaringe, com melhores resultados ao tratamento e um prognóstico positivo (Geisler et al., 2002; Näsman et al., 2009; Nguyen et al., 2010; Broglie et al., 2013; Cerezo et al., 2013; Stephen et al., 2013; Shinohara et al., 2014; Karpathiou et al., 2016; Fakhry et al., 2017; Ottria et al., 2018).

Castellsagué et al. (2016) analisaram 3680 amostras de câncer de cabeça e pescoço através de um estudo multi-institucional. As amostras de carcinoma de células escamosas foram coletados da cavidade oral (n= 1264), faringe (n=1374) e laringe (n=1042), oriundos de 21 países da Europa e das Américas Central e do Sul.

Todas as amostras foram analisadas no Instituto de Oncologia da Catalunha/Espanha. Esse estudo teve como objetivo analisar o HPV como fator de carcinogênese e a sua frequência através de biomarcadores: HPV-DNA, HPV E6IRNA e/ou p16INK4a. As estimativas positivas para o HPV pelo HPV-DNA e HPV E6IRNA ou p16INK4a foram 22.4%, 4.4% e 3.5% para o câncer da orofaringe, cavidade oral e laringe respectivamente; e 18.5%, 3.0% e 1.5% quando considerada a positividade simultânea para os três marcadores (Castellsagué et al., 2016).

Outra característica importante foi a localização dos subsítios próximos à orofaringe onde foi identificada uma maior frequência do HPV. Os autores observaram que tanto na cavidade oral quanto na laringe os subsítios proximais à orofaringe mostraram uma prevalência mais elevada dos HPVs do que aqueles distais à orofaringe. Assim, os HPVs em subsítios da cavidade oral combinados, proximais à orofaringe, variaram de 4,9% para 6,7% (quando considerados os HPV-DNA mais E6IRNA e/ou p16INK4a) *versus* 1,4% a 2,3% nos subsítios distais à orofaringe ( $p < 0.01$  para ambas as comparações). Os valores correspondentes na laringe foram 4,2% a 4,2% *versus* 1,4% a 3,4% em subsítios combinados que eram proximais *versus* distais à orofaringe (Castellsagué et al., 2016).

Entretanto, essas diferenças não foram estatisticamente significantes. O HPV 16 foi o tipo mais comum. As estimativas do HPV na orofaringe foram as mais altas

na América do Sul, Central, Leste Europeu e Norte da Europa, e mais baixa no Sul da Europa. As mulheres mostraram maior incidência do HPV que os homens para o câncer de orofaringe na Europa e para a laringe na América Central e do Sul. A contribuição do HPV para os cânceres de cabeça e pescoço tem sido substancial, mas altamente heterogênea de acordo com o local, região e sexo. O estudo mostrou uma maior frequência do HPV como agente da carcinogênese no carcinoma de orofaringe, porém em outros sítios da região da cabeça e pescoço o seu papel não ficou bem estabelecido como o agente causal. (Castellsagué et al., 2016).

#### 1.3.2.1 A proteína p16, grau de expressividade e mutações: implicações prognósticas

##### 1.3.2.1.1 Aspectos Desfavoráveis Estruturais ou Funcionais

Bova et al., (1999) estudaram 143 pacientes com carcinoma de células escamosas na porção anterior da língua. A perda da expressividade da proteína p16INK4A foi observada em 55% dos pacientes portadores desses tumores (78 de 143 pacientes). Houve uma redução do tempo livre de doença ( $p=0.007$ ) e da sobrevida ( $p=0.014$ ). A perda da expressividade da proteína p16INK4A na presença da hiper expressividade da ciclina D1 conferiu um menor tempo livre de doença ( $p = 0.011$ ) e uma pior sobrevida ( $p = 0.002$ ) em 5 anos (Bova et al., 1999).

Os dados de baixa expressividade da proteína p16INK4A e a hiper expressividade da ciclina D1 demonstraram uma recorrência mais precoce e uma redução da sobrevida nos pacientes com carcinoma de células escamosas na porção anterior da língua (Bova et al., 1999).

Entretanto, em um estudo de coorte prospectivo com 171 pacientes diagnosticados com câncer de cabeça e pescoço, Geisler et al. (2002) observaram a perda de expressividade da proteína p16, sem contudo, estar relacionada à morte por causa específica da doença. Os autores chamaram a atenção para a inativação da proteína p16 em mais de 80% dos cânceres de cabeça e pescoço, pulmão, mama, melanoma, pâncreas e cérebro (Geisler et al. 2002).

Yuen et al. (2002) avaliaram a expressividade da proteína p16 no tratamento cirúrgico de 225 pacientes com carcinoma de células escamosas da cavidade oral, laringe, orofaringe e hipofaringe, no período de 1978 a 2000. Esses pacientes foram submetidos à cirurgia exclusiva, ou cirurgia seguida de radioterapia. As amostras

colhidas foram de carcinoma escamoso de 44 tumores da cavidade oral, 24 tumores da faringe e 147 tumores de laringe (Yuen et al., 2002). A diminuição da expressividade da proteína p16 foi identificada em 48% dos carcinomas de células escamosas (Yuen et al., 2002). A maior diminuição da proteína p16 foi encontrada nos carcinomas de laringe, comparados aos carcinomas de faringe e de cavidade oral (Yuen et al., 2002).

Houve correlação significativa entre a diminuição da proteína p16 e os tumores com estádios T mais avançados. Não houve correspondência entre a expressividade do p16 com sexo, idade, grau de diferenciação neoplásica, metástases linfonodais, recorrência ou sobrevida. A conclusão desse estudo foi a baixa expressividade da proteína p16 nos tumores de cabeça e pescoço, especificamente os tumores da laringe (Yuen et al., 2002). A regulação negativa da proteína p16 contribuiu para uma neoplasia mais avançada no local de origem devido à maior proliferação celular (Bova et al., 1999; Yuen et al., 2002; Colombo e Rahal, 2009; Castellsagué et al., 2016).

A perda da expressividade do p16 por deleção, mutação ou hipermetilação é muito comum nos cânceres de cabeça e pescoço (Broglie et al., 2013). O tabaco e/ou alcoolismo parecem contribuir na desregulação do p16 e na mutação do gene TP53, favorecendo a hiper expressividade da proteína p53 e a diminuição ou mutações na proteína p16. Essa sequência traduz um pior prognóstico aos pacientes com carcinoma de cabeça e pescoço (Bova et al., 1999; Namazie et al., 2002; Yuen et al., 2002; Worsham et al. 2006; Psyrri e DiMaio, 2008; Ernoux-Neufcoeur et al., 2011; Broglie et al., 2013; Britto, Paula e Saddi, 2014; Perri et al., 2015).

No trabalho de Settle et al. (2009a) a ausência da expressividade da proteína p16 resultou na piora da sobrevida dos caucasianos e, em especial, dos africanos. Cabe ressaltar que, segundo os autores, a sobrevida negativa dos africanos tinha influências de ordem sociocultural, além da situação dos marcadores(proteínas) moleculares e do quadro mais agressivo da doença (Settle et al., 2009a). A ausência do HPV16 e da proteína p16 indicaram o pior prognostico, para todos os sítios.

Smith et al. (2010), ao compararem também a situação negativa do HPV 16/proteína p16 e o p53 positivo ratificaram a piora da sobrevida em relação aos pacientes HPV 16/proteína p16 positivo e o p53 negativo (Settle et al., 2009a; Smith et al., 2010). Nos demais sítios anatômicos outros autores corroboraram a frequência do HPV no carcinoma de laringe em 24% e no carcinoma oral em 23%, destacando esse agente como um dos promotores da carcinogênese, porém de forma menos

intensa. (Kreimer et al., 2005; Settle et al., 2009a; Smith et al., 2010; Stephen et al., 2012).

A partir de um estudo observacional realizado entre os hispânicos, brancos não hispânicos e negros, Schrank et al. (2011) identificaram o comportamento distinto do carcinoma de células escamosas de orofaringe pelo HPV, no período entre 1998 a 2002. De forma semelhante à população negra, as condições socioeconômicas precárias dos hispânicos também interferiram de modo a desfavorecer a evolução da doença, independente da presença do HPV. O pior prognóstico ficou com a população negra e o HPV negativo (Schrank et al., 2011).

Silva et al. (2012) avaliaram 40 pacientes com carcinoma na orofaringe e 35 pacientes com carcinoma na laringe. A expressividade da proteína p16(INK4a) foi analisada com os achados clínico-patológicos. A expressividade negativa dessa proteína relacionou-se ao maior risco de morte. Ou seja, houve uma maior progressão da doença tanto na orofaringe como na laringe (Silva et al., 2012). Porém, a presença da proteína p16(INK4a) mostrou uma sensibilidade específica ao HPV, especialmente na orofaringe, assim como um melhor prognóstico, compatível com estudos apresentados por outros autores. (Schrank et al., 2011; Laco et al., 2012; Stephen et al., 2012; Stephen et al., 2013; Deng et al., 2014).

Hernandez et al. (2016) analisaram a expressividade da proteína p16 na base populacional de amostras com carcinoma de células escamosas de laringe nos EUA. As amostras utilizadas foram aquelas previamente genotipadas para o DNA do HPV. Nesse trabalho, a expressividade da proteína p16 foi encontrada, em oito amostras de tecido laríngeo (7,9%), num total de 101 casos. A expressividade da proteína p16 foi obtida em dois dos 16 casos determinados como positivos para o DNA do HPV (12,5%) (Hernandez et al., 2016). Os dois casos positivos para a proteína p16 e o DNA do HPV foram carcinomas de células escamosas não queratinizantes. A positividade da proteína p16 e/ou DNA do HPV não foi associada à sobrevida de 5 anos (Log-rank p valor = 0,55). Nesse estudo o HPV teve um papel muito limitado na carcinogênese laríngea. A proteína p16 não foi considerada um substituto para o HPV, além de não ter apresentado características preditivas na sobrevida dos pacientes com carcinoma de laringe (Hernandez et al., 2016).

### 1.3.2.1.2 Aspectos favoráveis

Reimers et al. (2007) analisaram 106 casos de carcinoma de células escamosas de orofaringe para verificar HPV-DNA, expressividade do p16, o EGFR e a relação com o tempo livre de doença e a sobrevida geral. A expressividade da proteína p16 foi altamente correlacionada com o HPV-DNA ( $p < 0.001$ ). Numa análise univariada revelou um maior tempo livre de doença nos pacientes com a proteína p16 positiva, comparados aos pacientes p16 com a proteína negativa (84% vs. 49%,  $p = 0.009$ ), em 5 anos (Reimers et al., 2007).

Os pacientes com tumores EGFR negativos também mostraram uma tendência positiva no tempo livre de doença (74% vs. 47%,  $p = 0.084$ ) e na sobrevida geral (70% vs. 45%,  $p = 0.100$ ), comparados aos EGFR positivos. A maior significância confirmou-se nos pacientes com tumores com o p16+/EGFR-. Esses pacientes tiveram (93%) de tempo livre de doença comparados aos (39%) dos pacientes p16-/EGFR+ ( $p = 0.003$ ) e, na sobrevida geral, (79%) dos pacientes p16+/EGFR- comparados aos (38%) de pacientes p16-/EGFR+, respectivamente em 5 anos ( $p = 0.010$ ) (Reimers et al., 2007). Nesse estudo, os dados indicaram que a expressividade da proteína p16 pode ser um marcador confiável para o carcinoma de células escamosas de orofaringe, além de ser um bom substituto para determinar o HPV como positivo no carcinoma de células escamosas da orofaringe (Reimers et al., 2007; Stephen et al., 2013; Karpathiou et al., 2016). Pacientes com tumores HPV+/p16+ mostraram uma diminuição do EGFR, mas ambos marcadores imunohistoquímicos apresentaram implicações prognósticas diferentes (Reimers et al., 2007).

Smeets et al. (2007) destacaram a importância da proteína p16 como marcador prognóstico nos carcinomas de orofaringe, embora haja um percentual de 15% a 20% de proteína p16 positiva e o HPV16 negativo. A expressividade da proteína p16 tem sido caracterizada como um bom marcador pela ação oncogênica do HPV (Reimers et al., 2007; Smeets et al., 2007; Stephen et al., 2013; Karpathiou et al., 2016). A transcrição do oncogene E7 permeia a regulação da proteína p16 (Fakhry et al., 2008).

Sugere-se que os carcinomas com a hiper expressividade dessa proteína representem como causa o HPV, nesse processo da carcinogênese (Von Knebel, 2002; Smeets et al., 2007; Fakhry et al., 2008; Wittekindt et al., 2008; Lassen et al., 2009). O HPV, principalmente o tipo 16 tem recebido destaque como um fator de risco

para o carcinoma de orofaringe, contudo o seu papel não ficou claro nos demais sítios da cabeça e pescoço. (Von Knebel, 2002; Smeets et al., 2007; Lassen et al., 2009).

A melhor sobrevida atribuída aos pacientes com HPV positivo deve-se à melhor resposta à radioterapia com quimioterapia (Fakhry et al., 2008; Ang et al., 2010).

Ang et al. (2010) compararam duas modalidades de tratamento com a radioterapia no carcinoma de células escamosas de orofaringe nos estádios III e IV: Radioterapia hiperfracionada com reforço localizado e a radioterapia padrão sensibilizada pela cisplatina. Os modelos randomizados foram comparados ao risco de óbito entre os pacientes com tumor HPV positivo e HPV negativo. 63.8% (206 de 323) dos pacientes tinham tumores HPV positivo. Esses tiveram melhor sobrevida em 3 anos (82.4%), na comparação com os pacientes com tumor HPV negativo (57.1%). O risco de óbito aumentou significativamente com o tabagismo.

A presença do HPV, o tabagismo, o estadiamento neoplásico e a presença de metástases linfonodais determinaram a estratificação de risco dos pacientes (Ang et al., 2010). Pacientes com tumores HPV positivo são sempre considerados de baixo risco, exceção aos fumantes com consumo igual ou superior a 10 maços/ano, associados aos linfonodos N2b a N3, que passam a ser risco intermediário. Também considerados como risco intermediário, os pacientes com tumores HPV negativos, portadores de tumores T2-T3, fumantes que consomem até 10 maços/ano. Todos os demais pacientes com tumores HPV negativo são considerados de alto risco. A expressividade da proteína p16 igual ou superior a 70%, no citoplasma e no núcleo das células, foi considerada como tumor HPV positivo (Ang et al., 2010). Pacientes com tumores HPV positivo foram mais frequentes em brancos, jovens, sem ou mínima história de tabagismo, boa performance nutricional, sem anemia e portadores de tumores pequenos. Não houve diferença na sobrevida entre as duas modalidades de tratamento nos pacientes com tumor HPV positivo.

Já os pacientes com tumores HPV negativo foram mais resistentes ao tratamento, encontravam-se em estádios mais avançados, além de desenvolverem com maior frequência, um segundo tumor primário. Ficou evidente que a forte associação ao tabagismo, modificou a resposta ao tratamento, de forma negativa; aumentando o risco de óbito para os pacientes com tumor HPV positivo (Ang et al., 2010).

Laco et al. (2012) ao analisarem 48 pacientes com carcinoma de células escamosas de cavidade oral e 44 pacientes com carcinoma de células escamosas de

orofaringe, mostraram a forte sensibilidade e especificidade da proteína p16 com a infecção por HPV. Houve uma maior incidência de tumores por HPV em orofaringe, particularmente na tonsila amigdalina, com melhor prognóstico em relação aos tumores desenvolvidos na cavidade oral, menor incidência de tumores por HPV na cavidade oral, com maior número de recorrências loco regionais e menor tempo de sobrevida (Laco et al., 2012). Nessa casuística, os autores compatibilizaram seus resultados com outros estudos, consagrando o carcinoma de células escamosas de orofaringe por HPV e a expressividade positiva da proteína p16 como uma doença distinta do carcinoma com o HPV e a expressividade da proteína p16 negativos (Reimers et al., 2007; Smeets et al., 2007; Ang et al., 2010; Smith et al., 2010; Laco et al., 2012; Stephen et al., 2012; Stephen et al., 2013). Esses achados reproduziram-se de forma semelhante ao estudo multi-institucional, realizado por Fakhry et al. (2017); entre 239 pacientes com carcinoma de células escamosas de orofaringe e 621 pacientes com carcinoma de células escamosas em outros locais da via aérea digestiva superior. Os autores constataram uma melhor sobrevida para os pacientes com a proteína p16 positiva relacionados ao HPV, no carcinoma de células escamosas de orofaringe. Para os demais tumores não originários da orofaringe, a expressividade da proteína p16 em relação ao HPV mostrou-se menor, sem interferir significativamente no prognóstico ( Von Knebel, 2002; Reimers et al., 2007; Smeets et al., 2007; Fakhry et al., 2008; Wittekindt et al., 2008; Lassen et al., 2009; Ang et al., 2010; Weinberger et al., 2010; Chernock et al., 2011; Isayeva, Yufeng e Maswahu, 2012; Cerezo et al., 2013; Stephen et al., 2013; Fakhry et al., 2017).

Stephen et al. (2013) analisaram caucasianos americanos e os americanos de descendência africana. Demonstraram o melhor prognóstico da proteína p16 positiva relacionado ao HPV16 positivo na orofaringe. A expressividade da proteína p16 foi detectada significativamente na orofaringe (65%) e nos demais sítios (13%) ( $p < 0.0001$ ) (Stephen et al., 2013).

Os pacientes caucasianos americanos tinham a expressividade da proteína p16 acentuadamente na orofaringe. Para os demais sítios, não houve diferenças entre as raças.

Na orofaringe houve uma estreita associação entre o HPV16 e a proteína p16. A presença da proteína p16 aumentou o tempo de sobrevida para os pacientes em todos os sítios estudados. A ausência da proteína p16 entre os caucasianos americanos e os descendentes africanos mostrou-se desfavorável à sobrevida, na



análise de todos os subsítios. Paralelamente, os pacientes HPV positivo tinham uma melhor sobrevida dos que os pacientes HPV16 negativo (Stephen et al., 2013). Na orofaringe, entre os pacientes com a proteína p16 e HPV16 positivos, comparados aos pacientes com a proteína p16 positiva e o HPV16 negativo e os pacientes com a proteína p16 negativa e o HPV16 positivo, observou-se uma piora da sobrevida dos dois últimos em relação ao primeiro. A situação dos pacientes HPV16 e proteína p16 negativos mostrou a pior sobrevida, em todos os grupos. Nos casos de orofaringe, a relação do HPV16 positivo com a sobrevida, comparado ao HPV16 negativo, favoreceu os caucasianos. Cabe ressaltar que não houve significância estatística entre proteína p16 positiva/HPV16 negativo e os pacientes com a proteína p16 positiva/HPV16 positivos, em relação à sobrevida. A ausência da proteína p16 e do HPV16 proporcionaram uma evolução pior, nos pacientes com carcinoma de células escamosas de todos os sítios, com maior índice de recidiva e óbitos (Stephen et al., 2013). Esse fato sugere a existência de outros fatores que comprometem a sobrevida desses pacientes. A baixa estimativa do HPV16 e da proteína p16 nos africanos, comparados aos caucasianos, foram compatíveis aos achados de outros autores (Settle et al., 2009a; Settle et al., 2009b; Weinberger et al., 2010; Chernock et al., 2011; Schrank et al., 2011)

Britto, Paula e Saddi. (2014) ao selecionarem um estudo de 225 pacientes com tumores em cabeça e pescoço observaram a prevalência da proteína p16 em 48%. Nesse estudo houve uma correlação com tumores mais avançados inicialmente irradiados porém com pouca resposta terapêutica. Os autores observaram a baixa prevalência da proteína p16 com estádios avançados da doença; não necessariamente um pior prognóstico para o tratamento cirúrgico (Britto, Paula e Saddi, 2014). A proteína p16 diminuída parece consolidar uma transformação neoplásica mais agressiva, e quando presente e mais expressa nos tumores de orofaringe favorece o tratamento. Logo, níveis de proteína p16 diminuídos ou mutantes são consideradas de mau prognóstico (Bova et al., 1999; Von Knebel, 2002; Yuen et al., 2002; Wittekindt et al., 2008; Lassen et al., 2009; Settle et al., 2009<sup>a</sup>; Ang et al., 2010; Weinberger et al., 2010; Chernock et al., 2011; Laco et al., 2012; Stephen et al., 2013; Britto, Paula e Saddi, 2014).

Nessa revisão sistemática realizada por Britto, Paula e Saddi (2014), eles chamam a atenção para a estreita relação da proteína p16 com a proliferação celular,

embora a mesma não ter sido útil na diferenciação do epitélio displásico e não displásico da mucosa oral. (Abrahão et al., 2011).

O carcinoma de células escamosas originado na hipofaringe permanece um grande desafio ao tratamento. Sua prevalência é de 3% a 5% dos tumores na região da cabeça e pescoço. São os tumores de pior prognóstico. O nível de sobrevida é de 15% a 30% em 5 anos. Dois terços dos pacientes ao diagnóstico já apresentam metástases linfonodais e 40% possuem metástases linfonodais ocultas contra laterais.

Wendt et al. (2014) analisaram 109 pacientes com estágio III e IV de carcinoma na hipofaringe. A presença do HPV e a expressividade da proteína p16 foram avaliados na sobrevida. Apenas sete pacientes eram HPV positivo, quatro eram HPV positivo 16; os outros três dividiram-se em HPV 53, HPV 56, HPV51. 16% (n=18) dos 109 pacientes tinham proteína p16 positiva. Todos os quatro pacientes HPV16 positivo tinham a proteína p16 positiva.

Dos 18 pacientes que tinham a proteína 16 positiva, apenas 4% tinham HPV16 positivo. Apesar do pequeno número de pacientes com HPV16 positivo, a sobrevida foi melhor comparada aos demais. (Wendt et al., 2014) A expressividade da proteína p16 não teve uma correspondência adequada com o HPV16. Dos quatro pacientes com HPV16 positivo e a proteína p16 positiva, três pacientes estavam vivos, há mais de 5 anos, sem sinal de doença. E o quarto paciente morreu após 3 anos, por outra causa, não neoplásica. O estudo ressaltou a baixa prevalência do HPV16 e da proteína 16 na patogênese do carcinoma de células escamosas na hipofaringe. Embora a sobrevida tenha sido melhor nos poucos casos de HPV16 e proteína p16 positiva, não foram importantes na carcinogênese da hipofaringe. O tabagismo e o etilismo parecem ter justificado mais o carcinoma de células escamosas na hipofaringe do que a presença do HPV. (Wendt et al., 2014).

### **1.3.3 Associação entre os marcadores p53 e p16**

Geisler et al. (2002) publicaram um estudo de coorte prospectivo com 171 pacientes com carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, tratados por radioterapia. O objetivo do estudo, era verificar o comportamento das proteínas p53 e p16. Os pesquisadores observaram que os pacientes com aumento da expressividade da proteína p53 tiveram duas vezes mais chance de óbito e três vezes

mais mortalidade devido à doença, após 550 dias de tratamento. Os pesquisadores não constataram nenhuma informação diagnóstica para expressividade acentuada da proteína p53. Pacientes cujos tumores tinham aumento da expressividade da proteína p53 e que receberam radioterapia morreram três vezes mais, após o ajuste da idade e do estadiamento, do que pacientes que não expressavam aumento da proteína p53, mas que receberam o mesmo tratamento por radioterapia. De acordo com o estudo, o aumento da expressividade da proteína p53 caracterizou maior recorrência e um declínio da sobrevida, para ambos os gêneros.

Pacientes que não tinham a expressividade da proteína p16, tratados por radioterapia, tiveram menos risco de recorrência loco regional, comparados com aqueles que evidenciaram uma leve expressividade basal da proteína p16. Porém a proteína p16 não estava relacionado à piora do prognóstico. Em pacientes que tiveram diminuição da expressividade do p16 e que não receberam RT, não foi observada nenhuma relevância na mortalidade e na recorrência (Geisler et al., 2002).

Ernoux-Neufcoeur et al. (2011) publicaram uma casuística de 75 pacientes com carcinoma de células escamosas, estágio IV de hipofaringe. Foram avaliados HPV DNA, as proteínas p16, p21 e o p53 no prognóstico desses pacientes. A relação da oncoproteína p16 foi demonstrada com o HPV DNA – como já discutido em estudos anteriores (Begun et al., 2003; Weinberger et al., 2006). O prognóstico foi semelhante nos poucos casos de hrHPV positivo com o HPV negativo, mesmo na baixa expressividade do hrHPV/p16. Já o aumento da expressividade da proteína p53 nos pacientes com estágio IV mostrou-se negativo, na sobrevida (Ernoux-Neufcoeur et al, 2011).

Wang et al. (2012) analisaram o polimorfismo genético do p53 com a infecção por HPV e o risco de câncer oral. A população foi representada por pacientes jovens, faixa etária menor que 50 anos, com maior risco de infecção por HPV. Os achados desse estudo sugerem que o tabagismo não modificou a relação entre o polimorfismo do p53 e a suscetibilidade à infecção por HPV no risco estimado para o câncer oral (Wang et al., 2012).

Boglie et al. (2013) analisaram a resposta de pacientes portadores de carcinoma de células escamosas de orofaringe estágio III e IV à radioterapia e quimioterapia concomitantes com a radioterapia com reforço, utilizando a mesma classificação de Ang et al.(2010).

Considerando as classificações de baixo, intermediário e alto risco, acrescidos da análise da proteína p53 e mais um fator de risco, o etilismo. Nessa pesquisa a hiper expressividade da oncoproteína p16 e a infecção por HPV mostraram relevância no prognóstico desses pacientes (Broglie et al., 2013). Os fatores como a hiper expressividade da proteína p53 foi importante na piora do prognóstico dos pacientes tabagistas e, principalmente, nos etilistas. Pacientes com tumores p53 negativo e p16 positivo tiveram uma melhor sobrevida e menor recorrência (Broglie et al., 2013). Os pacientes com alto risco tiveram menor sobrevida em relação ao baixo risco (Ang et al., 2010; Broglie et al., 2013). Não houve diferença estatística entre o risco intermediário e o baixo risco. Nessa casuística, a proteína p53 foi mais confiável como marcador prognóstico do que a própria proteína p16 e o DNA do HPV positivo (Broglie et al., 2013).

Merece destaque o trabalho de Shinohara et al. (2014), desenvolvido no carcinoma de células escamosas na orofaringe. O estudo constituiu em uma análise comparativa entre as quatro situações das proteínas (marcadores) p53 e p16: Positividade simultânea das proteínas p53 e p16, somente a proteína p53 positiva, somente a proteína p16 positiva e ambas proteínas negativas (Shinohara et al., 2014). Foram avaliados 53 pacientes. A melhor sobrevida prevaleceu nos pacientes com somente a proteína p16 positiva. Os pacientes com apenas a proteína p53 positiva tiveram melhor sobrevida que os pacientes com a positividade simultânea das proteínas, ou a ausência das mesmas. A pior sobrevida foi registrada nos pacientes com as proteínas (marcadores) p53 e p16 negativas (Shinohara et al., 2014).

Karpathiou et al. (2016) estabeleceram que os tumores com a proteína p16 positiva estavam ligados a uma resposta do hospedeiro com os linfócitos T a um fenótipo não queratinizante. Essas observações descritas compõem um estudo de 120 pacientes com carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço. Não houve uma associação nítida entre a proteína p16, a sobrevida, o tempo livre de doença ou a situação linfonodal. Entretanto, esteve presente o estadiamento mais precoce. A expressividade da proteína p16 foi de 20,8% e a média de expressividade da proteína p 53 foi de 60%. O local do desenvolvimento do tumor foi significativo com a expressividade da proteína p16 ( $p=0.0106$ ), principalmente na orofaringe (Karpathiou et al., 2016). As proteínas p16 positiva e a proteína p53 não mutante foram associados ao estágio mais precoce do tumor ( $p = 0.0006$  e  $p = 0.0047$ ) respectivamente. A maioria dos tumores não queratinizantes foram p16 positivo

(73,7%) (Karpathiou et al., 2016). A carcinogênese provocada pelo HPV na orofaringe desencadeou a formação de células imaturas, basalóides, pouco diferenciadas, originárias das criptas tonsilares.

Não houve diferença estatística entre os tumores queratinizantes com a proteína p16 positiva e a proteína p16 negativa, considerando o tempo livre de doença ou a sobrevida (Karpathiou et al., 2016). O local de origem do tumor mostrou ser relevante, preditivo no curso da doença, baseado na expressividade dos marcadores, notadamente a proteína p16 na orofaringe, com bons resultados. Porém, o mesmo não ocorreu nos sítios da laringe e da hipofaringe (Karpathiou et al., 2016).

Sathyamurthy et al. (2016) analisaram a resposta à radioterapia e quimioterapia concomitantes (cisplatina) de 25 pacientes portadores de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, comparando com a expressividade das proteínas (marcadores) p53, EGFR e o p16. A positividade para o EGFR foi de 84%, para a proteína p53 foi 76% e a positividade para o HPV-p16 foi 28%. Todos os 25 pacientes tiveram resposta completa em 52% (13), resposta parcial 28% (7), doença estável 12% (3) e 8% (2) tinham doença progressiva. Não houve significado estatístico entre EGFR ( $P=0.5$ ) e o HPV-p16 positivo ( $p=0.8$ ) em relação à resposta. Todavia, a positividade do p53 foi quase significante a uma boa resposta (Sathyamurthy et al., 2016). Só houve significância entre o p16 e o tabagismo ( $p=0.01$ ). Entretanto, não houve correlação significativa com as outras variáveis como a idade, sexo e situação socioeconômica (Sathyamurthy et al., 2016).

Wang et al. (2016) mostraram que a presença de mutações no gene P53 e o aumento do seu conteúdo proteico (p53) determinam uma maior agressividade nos tumores da orofaringe. Contudo, sem relação definida com o tabagismo. Os autores mostraram as diferenças epidemiológicas entre a população dos países ocidentais com os países asiáticos, comparando os seus estilos de vida. Esse foi o primeiro estudo retrospectivo na China, onde foram avaliados infecção pelo HPV, TP53/mutações e o conteúdo proteico com o prognóstico do carcinoma de células escamosas na orofaringe (Wang et al., 2016). O grupo avaliado era constituído por pacientes predominantemente fumantes e etilistas, com a média de idade entre 50 a 61 anos. O local mais frequente do tumor foi a base da língua, contrariamente às publicações dos EUA, Japão e Coréia do Sul, em que a tonsila amigdaliana foi o local mais comum. A infecção por HPV teve baixa incidência como fator de risco para o carcinoma de orofaringe, possivelmente determinado pelo comportamento e estilo de

vida dessa população (Wang et al., 2016). Os pacientes HPV positivo e fumantes tiveram um péssimo prognóstico, porém não relacionado à infecção. Tanto os pacientes HPV positivo como os pacientes HPV negativo não diminuíram o tabagismo. Os pacientes HPV positivo dessa pesquisa possuíam um perfil diferente dos pacientes HPV positivo dos EUA e da Europa, os quais eram mais jovens e não fumantes. Em relação ao gene P53, os pacientes sem as mutações nos éxons 5-8 tiveram melhor prognóstico. A própria expressividade da proteína p53 foi a estratificação das mutações dos genes nesses tumores. Pelo resultado do estudo não ficou claro o papel prognóstico entre a expressividade das proteínas p53 e p16 associadas aos pacientes tabagistas e não tabagistas (Wang et al., 2016).

A recidiva loco regional ou a distância são situações muito difíceis de resgate dos pacientes com carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço. Para avaliar a influência dos marcadores na recidiva, Rasmussen et al. (2017) correlacionaram as proteínas p53 e p16 nas recidivas de 196 pacientes com carcinoma de células escamosas de diferentes sítios anatômicos, tratados principalmente por radioterapia e quimioterapia concomitantes. A expressividade da proteína p53 positiva mostrou-se mais evidente na recidiva loco regional do que na disseminação à distância dos tumores não localizados na orofaringe, independente da expressividade positiva da proteína p16.

No carcinoma de orofaringe com a expressividade positiva da proteína p16, a presença da proteína p53 não mostrou diferença na recidiva local. Porém, na disseminação à distância, o maior comprometimento foi com a expressividade negativa da proteína p53. Esse estudo mostrou um perfil de maior falha loco regional na presença da proteína p53 em tumores não localizados na orofaringe (Rasmussen et al., 2017).

Lee et al. (2018) estudaram 45 pacientes com carcinoma de células escamosas, avançado de hipofaringe. A análise foi retrospectiva sobre a expressividade das proteínas p16 e p53. A maioria dos pacientes era do gênero masculino, com a média de idade de 63 anos. Os pacientes foram tratados com dois ciclos de quimioterapia de indução, seguidos de quimioterapia e radioterapia concomitante. 37.8% (17) dos pacientes exibiram resposta completa, 62.2% (28) exibiram resposta parcial; 24.4% (11) pacientes tinham proteína p16 positiva e 66.7% (30) pacientes tinham proteína p53 positiva. Não houve diferença significativa entre os pacientes com proteínas p16 positiva e negativa, relacionados à resposta à

quimioterapia, tempo livre de doença e à sobrevida geral. O mesmo ocorreu para os pacientes com baixa expressividade da proteína p53. Nesse estudo, ambas proteínas (marcadores) não foram preditivos a resposta à quimioterapia. A expressividade das proteínas p16 e p53 não evidenciou associação com a sobrevida desses pacientes com carcinoma de células escamosas na hipofaringe (Lee et al., 2018).

Apesar das controvérsias de vários estudos é necessário entender as etapas do ciclo celular e as suas divisões. Diversos fatores promovem alterações locais que resultam em mutações gênicas e proteicas por meio enzimático. Uma das consequências dessa cadeia de eventos pode ser o desenvolvimento de uma neoplasia. O conhecimento dessas proteínas oriundas de danos sobre o DNA é primordial para caracterizá-las como sinalizadores de risco ou proteção; particularmente no carcinoma de células escamosas da cavidade oral, laringe e faringe.

Esse conhecimento poderá ser a base de diretrizes futuras a uma terapêutica com menos efeitos colaterais ou sequelas cirúrgicas. Ou seja, proporcionar tratamentos adequados, com menor morbidade, melhores taxas de sobrevida e tempo livre de doença (Perri et al., 2015; Solomon, Young e Rischin, 2018; Ottria et al., 2018).

## **2. Objetivos**

---



## **2. OBJETIVOS**

Verificar a expressividade das proteínas p53 e p16 nos pacientes com diagnóstico de carcinoma de células escamosas na cavidade oral, laringe e faringe tratados no Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Rio Grande do Sul, no período de janeiro de 2014 a janeiro de 2018.

É um estudo prospectivo observacional longitudinal.

Foram registrados, inicialmente, 280 pacientes com diagnóstico de carcinoma de células escamosas na cavidade oral, laringe e faringe no Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço – HUSM/UFSM, no período de janeiro de 2014 a janeiro de 2018. Exclusão de 41 pacientes: 20 pacientes perdidos no seguimento inicial, 10 pacientes com o material gasto nas biópsias, seis pacientes foram transferidos para outro serviço, cinco pacientes com o material insuficiente e sem retorno ao serviço. O total de 239 pacientes diagnosticados, tratados e evoluídos no Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço – HUSM/UFSM, entre janeiro de 2014 a janeiro de 2018, dos quais 69 pacientes com câncer de cavidade oral, 79 pacientes com câncer de laringe e 91 pacientes com câncer de faringe.

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Instituição: CAAE:446429.156.0000.53.46

Os objetivos do estudo são:

### **2.1 Objetivo Geral**

Verificar a expressividade das proteínas p53 e p16, isoladas ou associadas, nos pacientes com carcinoma de células escamosas nos sítios da cavidade oral, laringe e faringe, através da imunohistoquímica dessas proteínas nos tumores dos espécimes cirúrgicos ou das biópsias.

#### **2.1.1 Objetivos específicos**

– Verificar a expressividade das proteínas p53 e p16, isoladas ou associadas, nos pacientes com carcinoma de células escamosas nos sítios da cavidade oral, laringe e faringe, através da Imunohistoquímica dessas proteínas nos tumores dos

espécimes cirúrgicos ou de biópsias e relacionar com o estadiamento e a disseminação linfonodal.

– Verificar a expressividade das proteínas p53 e p16, isoladas ou associadas, nos pacientes com carcinoma de células escamosas nos sítios da cavidade oral, laringe e faringe através da imunohistoquímica dessas proteínas nos tumores dos espécimes cirúrgicos ou de biópsias e relacionar com a sobrevida, no período de janeiro de 2014 a janeiro de 2018. A sobrevida foi calculada, baseando-se no tempo entre a primeira consulta até a última consulta do paciente, com a situação do paciente vivo ou morto; com o registro do óbito, no prontuário ou pelo serviço social. Também foi realizada a busca ativa dos pacientes para verificar a sua situação, quando os mesmos não compareciam ao ambulatório apesar dos retornos marcados ou ausência de evolução por mais de 3 meses, no período estudado entre janeiro de 2014 a janeiro de 2018.

– Verificar se a expressividade das proteínas p53 e p16, isoladas ou associadas, poderão corresponder a um aspecto de risco ou de proteção, relacionadas ou não ao sítio de desenvolvimento do carcinoma de células escamosas na cavidade oral, laringe e faringe dos 239 pacientes tratados entre o período de janeiro de 2014 a janeiro de 2018, no Hospital Universitário de Santa Maria – UFSM.

A entrada dos pacientes no estudo foi em janeiro de 2014 e houve seguimento desses pacientes por consulta ambulatorial ou por referência dos mesmos através da busca ativa até janeiro de 2018. Na pesquisa participaram todos os pacientes de primeira consulta que, após diagnóstico de carcinoma de células escamosas e tratados no Hospital Universitário de Santa Maria – UFSM, concordaram em participar do estudo. O seguimento, para fins estatísticos, foi considerado o período de três anos. (Razões: Pacientes com menos de um ano de evolução ou perdas por doença num período inferior a 12 meses).

### ***3. Metodologia***

---

### 3. METODOLOGIA

O método foi baseado na imunohistoquímica de tumores nos quais foram confirmados o diagnóstico de carcinoma de células escamosas de 239 pacientes com lesões suspeitas na cavidade oral, laringe e faringe, tratados e evoluídos no Hospital Universitário de Santa Maria – UFSM, no período de janeiro de 2014 a janeiro de 2018.

O estudo da expressividade desenvolveu-se para verificar a situação das proteínas p53 e p16, nos sítios primários das neoplasias, fazendo a relação com o estadiamento, a disseminação linfonodal, a sobrevida e as características de risco ou proteção para os pacientes com carcinoma de células escamosas na cavidade oral, laringe e faringe.

A hipótese diagnóstica apresentava-se pela história clínica e pelo exame específico da região da cabeça e pescoço nos locais apontados para a investigação. Após a realização da biópsia nas lesões suspeitas e o diagnóstico ser confirmado pela patologia (H.E.), a imunohistoquímica era encaminhada para verificar a presença das proteínas p53 e p16, além de elucidar a origem celular das lesões malignas indiferenciadas, localizadas nos sítios pré-determinados.

O estadiamento foi realizado pelo exame físico e exames específicos na área da cabeça e pescoço e de tórax.

A) Exames endoscópicos: videotelelaringoscopia, nasovideotelelaringofaringoscopia, endoscopia digestiva alta e broncoscopia.

B) Exames de Imagem: tomografia computadorizada e ressonância magnética.

C) O estadiamento, para fins de estudo, foi considerado o patológico para os pacientes tratados por cirurgia e o clínico para os pacientes tratados por radioterapia (RT) e quimioterapia (QT). Nesses últimos, caracterizamos o estágio clínico igual ao patológico.

D) Linfonodos positivos: todos os linfonodos com metástases presentes no exame de patologia para os pacientes tratados por cirurgia. Para os pacientes tratados com radioterapia e/ou quimioterapia concomitantes, consideramos linfonodos positivos metastáticos aqueles com aumento de tamanho dos linfonodos, acima do padrão de normalidade, aumento do número de linfonodos com as seguintes características: perda do contorno fusiforme habitual, aspecto arredondados, perda do hilo vascular, conglomerado de linfonodos fusionados, sinais de extravasamento

extra capsular. Na palpação, linfonodos aumentados de tamanho, endurecidos ou pétreos, diminuição de mobilidade ou fixos, massa cervical por fusão de linfonodos, com contornos irregulares. Não foi realizado o PET- CT porque o HUSM/UFSM não disponibiliza a tecnologia.

Essas características foram analisadas para todos os pacientes, independentemente do tipo de tratamento realizado.

E) Para fins de estudo da curva de sobrevida dos pacientes consideramos o período de três anos (estatístico): baseado no percentual de óbitos geral e óbitos por doença, nos pacientes diagnosticados, tratados e evoluídos com carcinoma de células escamosas na cavidade oral, laringe e faringe, no período de janeiro de 2014 a janeiro de 2018.

A classificação do estadiamento anatomopatológico: por grupos (I a IV) segundo a classificação do Manual do Estadiamento do Câncer (Edge, Byrd, Carducci et al., 2010).

O tratamento seguiu as diretrizes da literatura médica para o Carcinoma de Células Escamosas da Cavidade Oral, Laringe e Faringe, conforme o estadiamento, as condições clínicas dos pacientes e aceitação por parte dos mesmos, da conduta médica.

### **3.1 Critérios de Inclusão**

– Pacientes com carcinoma de células escamosas na cavidade oral, laringe e faringe diagnosticados, tratados e evoluídos no Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM-UFSM), que aceitaram a participar do estudo, no período de janeiro de 2014 a janeiro de 2018.

– Todos os pacientes com o diagnóstico de carcinoma espinocelular (CEC) na cavidade oral, laringe e faringe que, após receberam explicações e orientações sobre a pesquisa, autorizaram a utilizar o material dos seus tumores por meio de biópsias ou espécimes cirúrgicos, e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

– Pacientes de primeira consulta cujo material oriundo de biópsias realizadas no ambulatório ou no centro cirúrgico com anestesia geral, e confirmado o diagnóstico de CEC, que foram para tratamento cirúrgico ou de preservação de órgãos (clínico)

com radioterapia exclusiva ou radioterapia e quimioterapia concomitantes, ou tratamento paliativo (radioterapia).

- O material para a análise foi coletado somente do tumor primário dos espécimes cirúrgicos e não das metástases linfonodais. Foi realizada a confirmação imunohistoquímica do tumor primário com a biópsia prévia das lesões dos pacientes.

- No estudo entraram somente os pacientes com os seguimentos evoluídos desde a primeira consulta até a última evolução, referência atualizada por busca ativa ou constatação de óbito no período de janeiro de 2014 a janeiro de 2018.

- Pacientes sem tratamento prévio, transferidos de outros serviços, cujo material de biópsia pode ser utilizado para revisão de lâmina e avaliação imunohistoquímica, que foram tratados e seguidos no Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM-UFSM) no período observado, e aceitaram a participar da pesquisa.

### **3.2 Critérios de Exclusão**

- Pacientes diagnosticados e não tratados no Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM-UFSM), que foram para outros serviços ou que não se conseguiu o retorno dos mesmos, por busca ativa ou pela assistência social.

- Pacientes com outros diagnósticos histológicos e imunohistoquímicos de neoplasias que não confirmaram ser carcinoma de células escamosas.

- Pacientes com tratamento prévio por cirurgia ou radioterapia e/ou quimioterapia oriundos de outros serviços, em primeira consulta no Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço (HUSM-UFSM).

- Pacientes que foram perdidos no seguimento, seja após o diagnóstico ou após o tratamento, e não foram achados apesar da busca ativa, no período de janeiro de 2014 a janeiro de 2018.

- Pacientes cujo material das biópsias foi insuficiente ou houve gasto do mesmo sem condições de obter uma nova amostra.

- Pacientes que recusaram a participar da pesquisa. Observação: todos, na consulta inicial, foram esclarecidos sobre os objetivos e a metodologia da pesquisa. Somente entraram no estudo os pacientes que entenderam e autorizavam a coleta do material por meio do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

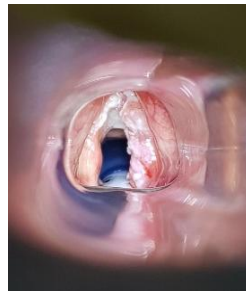
– Pacientes que apresentavam massa cervical metastática por carcinoma de células escamosas sem sítio primário conhecido na área de cabeça e pescoço foram excluídos do estudo.

– Pacientes na primeira consulta, sem condições clínicas para a biópsia, impossibilitando a coleta de material.

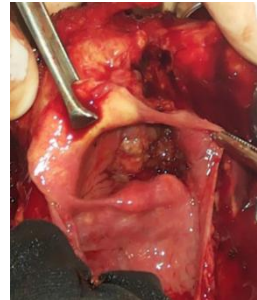
A seguir temos algumas imagens com exemplos de pacientes com carcinoma de células escamosas nos sítios primários: cavidade oral, laringe, orofaringe e hipofaringe, no HUSM-UFSM.



**Figura 1. CEC na Cavidade Oral(a)**



**Figura 2. CEC na Laringe(a)**



**Figura 3. CEC na Hipofaringe(a)**



**Figura 4. CEC na Cavidade Oral (b)**



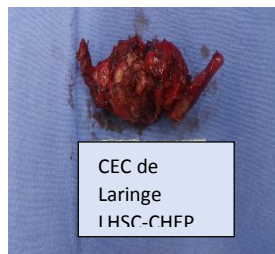
**Figura 5. CEC na Laringe (b)**



**Figura 6. CEC na Orofaringe (b)  
Palato mole-Pilar Amigdaliano**



**Figura 7. CEC na Cavidade Oral (c)**



**Figura 8. CEC na Laringe (c)**



**Figura 9. CEC –Orofaringe (c)  
Base de Língua**

### 3.3 Avaliação Imunohistoquímica: Metodologia

#### 3.3.1 A análise da expressividade das proteínas p53 e p16 pela imunohistoquímica

– O material utilizado foi dos espécimes cirúrgicos dos tumores primários de pacientes cirúrgicos ou das biópsias de tumores primários de pacientes que posteriormente foram tratados com a radioterapia e/ou quimioterapia.

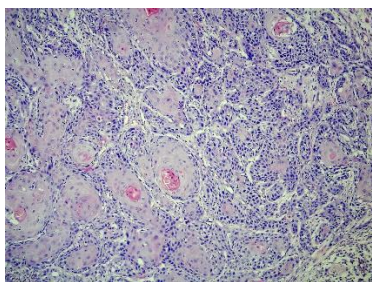
– A imunohistoquímica das biópsias dos pacientes cirúrgicos foi conferida com a imunohistoquímica dos espécimes cirúrgicos, a fim de verificar a compatibilidade.

– Não foram utilizados materiais oriundos das metástases linfonodais.

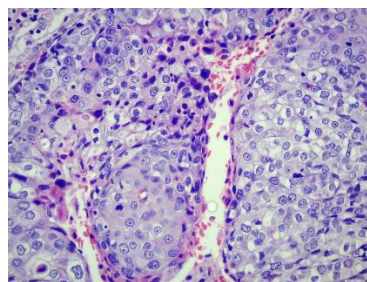
– Todo o preparo das lâminas por hematoxilina-eosina, os blocos de parafina com as amostras de tecido neoplásico, a escolha do controle (marcador), as lâminas para a avaliação imunohistoquímica das proteínas p53 e p16 foram realizadas no Serviço de Patologia do Hospital Universitário – UFSM, sob a supervisão da patologista responsável, Dra. Alessandra Saldanha Bastianello. A revisão da imunohistoquímica foi realizada por duas patologistas do Serviço de Patologia do Hospital Universitário de Santa Maria, em tempos diferentes, e depois foram confrontados os resultados. Em exames discordantes foram revistos a imunohistoquímica, o H.E. e até mesmo as peças cirúrgicas ou material das biópsias.

A seguir apresentamos um exemplo: lâminas com o diagnóstico de carcinoma de células escamosas preparadas por hematoxilina- eosina(HE) de um paciente com carcinoma espinocelular na laringe, diagnosticado e tratado no Hospital Universitário de Santa Maria (HUSM-UFSM).

Método de H.E. (Hematoxilina-eosina): diagnóstico de carcinoma de células escamosas (Serviço de Patologia do Hospital Universitário de Santa Maria - UFSM/RS).



**Figura 10. CEC - HE: Campo:**  
Tamanho com aumento de 20 vezes



**Figura 11. CEC-HE: Campo:**  
Tamanho com aumento de 40 vezes



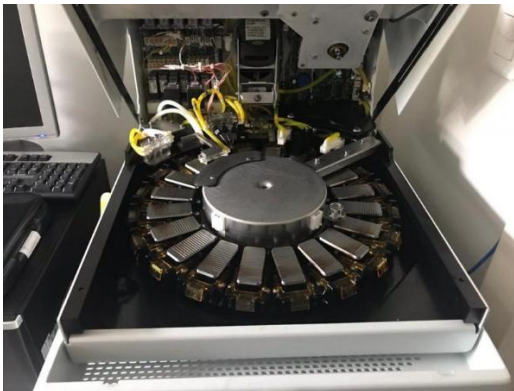
### 3.3.2 Imunohistoquímica

- O método de preparo das lâminas para o estudo imunohistoquímico das proteínas p53 e p16 dos carcinomas de células escamosas na cavidade oral, laringe e faringe foi desenvolvido por um sistema totalmente automatizado.
- A aplicação e o desenvolvimento do trabalho foi com Equipamento Benchmark GX Ventana (Alemanha). É um método totalmente automatizado e de excelente reprodutividade dos resultados. Esse equipamento seguiu protocolos padronizados para os marcadores; as proteínas p53 e p16.
- Foram realizadas secções em micrótomo dos blocos de parafina com o material originário dos tumores dos pacientes. Esses micrótomos foram distendidos em lâminas frias com carga elétrica.
- O processamento do preparo foi entre o antígeno da célula neoplásica com o anticorpo do marcador em várias etapas de formação das lâminas para a imunohistoquímica.
- Nas lâminas do material dos pacientes foram verificados:
  - a) A positividade de cada marcador (as proteínas p53 e p16) com o grupo controle
  - b) A quantificação conforme a coloração: núcleos das células (proteína p 53); núcleos e citoplasmas das células (proteína p16) (Wang et al., 1993; Galgano et al., 2010).

A seguir estão algumas fotos da máquina do Equipamento do Sistema Automatizado – Preparo das Lâminas de Imunohistoquímica dos Pacientes com CEC na cavidade oral, laringe e faringe do HUSM/UFSM – Janeiro de 2014 a janeiro de 2018.



**Figura 12. Equipamento Benchmark GX Ventana (Alemanha)  
Laboratório de Imunohistoquímica**



**Figura 13. Local de recepção  
das lâminas**



**Figura 14. Lâminas prontas para a  
avaliação para a Imunohistoquímica**

– Para verificar o nível de expressividade das proteínas p53 e p16 (marcadores)

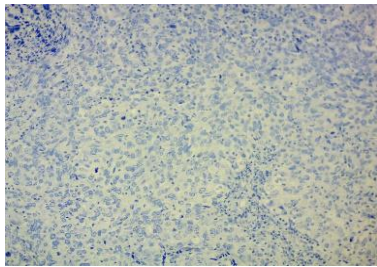
### 3.3.2.1 Proteína p 53 (marcador)

- a) p53: Negativo: presença de até 30% de células com o marcador no núcleo das células, num campo de menor aumento (4 vezes) com hot spots.
- b) p53 positivo nível A: presença de 31% a 50% de células isoladas com marcador no núcleo das células num campo de menor aumento (4vezes) com hot spots.

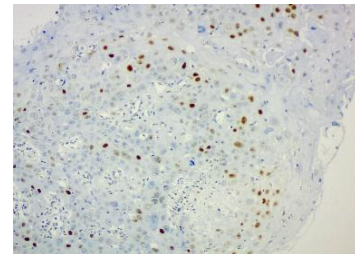
c) p53 positivo nível B: presença de 51% a 70% de agrupamento de células com marcador no núcleo das células num campo de menor aumento (4 vezes) com hot spots.

d) p53 positivo nível C: presença superior a 70% de células com extensão difusa com marcador no núcleo das células num campo de menor aumento (4 vezes) com hot spots.

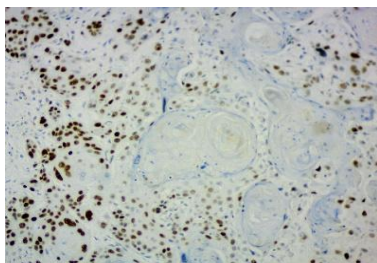
A seguir apresentamos imagens das lâminas da imunohistoquímica para a análise da proteína p53 no carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (Serviço de Patologia do Hospital Universitário de Santa Maria UFSM/RS).



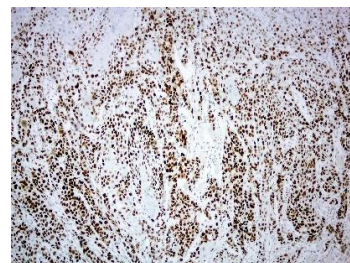
**Figura 15. p53 negativo: Campo: Tamanho com aumento 40 vezes**



**Figura 16. p53 nível A: Campo: Tamanho com aumento 40 vezes**



**Figura 17. p53 nível B: Campo: Tamanho com aumento 40 vezes**



**Figura 18. p53 nível C: Campo: Tamanho com aumento 40 vezes**

### 3.3.2.2 Proteína p16 (marcador)

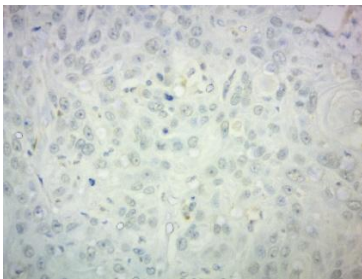
a) p16 grau 0: presença de células até 30%, com o marcador no núcleo e no citoplasma das células num campo de menor aumento (4 vezes) com hot spots.

b) p16 grau 1: presença de 31% a 50% de células com marcador no núcleo e no citoplasma das células: raras e dispersas células num campo de menor aumento (4 vezes) com hot spots.

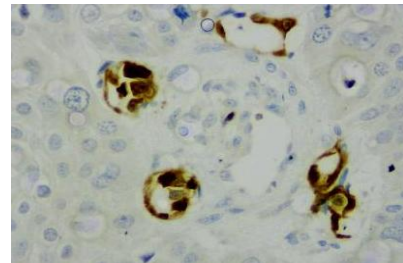
c) p16 Grau 2: presença de 51% a 70% de células com marcador no núcleo e no citoplasma com coloração forte, irregular frequente, não contínua além da membrana basal, num campo de menor aumento (4 vezes) com hot spots.

d) p16 Grau 3: presença superior a 70% de células com marcador no núcleo e no citoplasma com coloração forte, constante, difusa, contínua da membrana basal até além dos limites da lesão num campo de menor aumento (4 vezes) com hot spots.

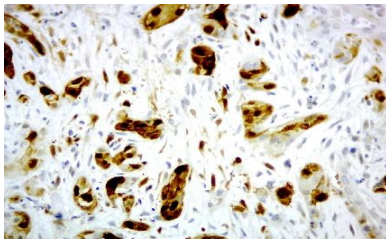
A seguir apresentamos imagens das lâminas da imunohistoquímica para a análise da proteína p16 no carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (Serviço de Patologia do Hospital Universitário de Santa Maria UFSM/RS).



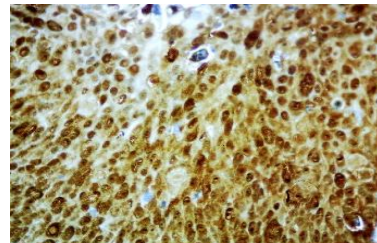
**Figura 19. p16 grau 0: Campo: Tamanho com aumento 40 vezes**



**Figura 20. p16 grau 1: Campo: Tamanho com aumento 40 vezes**



**Figura 21. p16 grau 2: Campo: Tamanho com aumento 40 vezes**



**Figura 22. p16 grau 3: Campo: Tamanho com aumento 40 vezes**

A seguir temos exemplos de lâminas de pacientes com carcinoma de células escamosas: H.E. (Hematoxilina-Eosina) e os marcadores: proteínas p53 e p16.



Figura 23. Foto de Lâminas: p53 e p16 com H.E (2 pacientes).

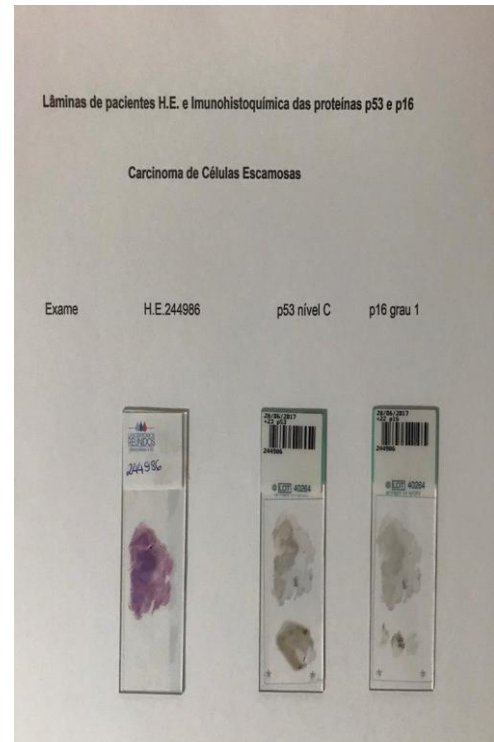


Figura 24. Foto de Lâminas: p53 e p16 com H.E. (1 paciente)

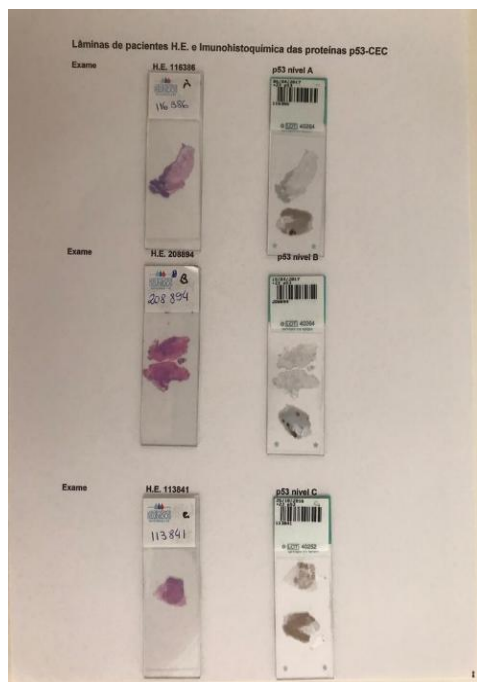


Figura 25. Lâminas p 53 positivo: H.E. e A, B, C do p53 (3 pacientes)

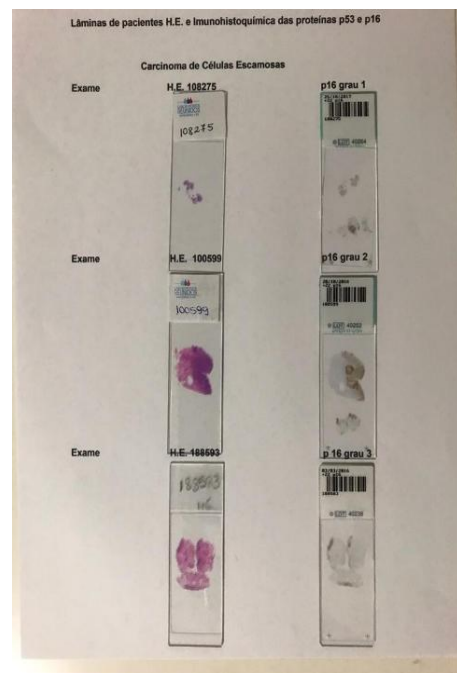
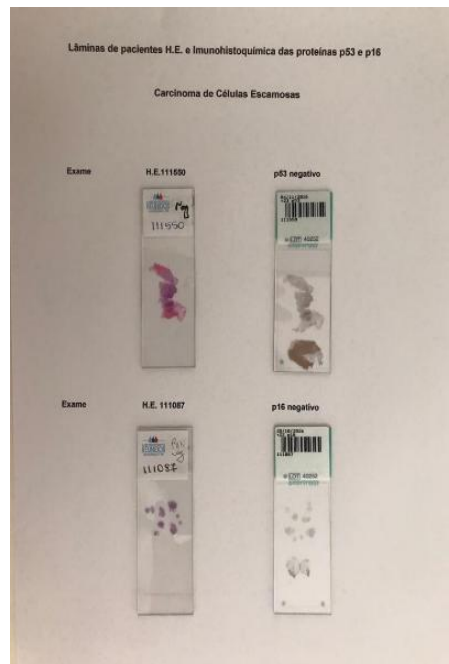


Figura 26. Lâminas p 16 positivo: H.E. e Níveis graus 1, 2, 3 do p16 (3 pacientes)





**Figura 27. Exemplo de Lâminas de pacientes com os p53 e p16 negativos com H.E. (2 pacientes)**



**Figura 28. Exemplo de Bloco de Parafina (tumor)**



**Figura 29. Blocos de Parafina**



**Figura 30. Reagentes para H.E.**



**Figura 31. Anticorpos para reação**

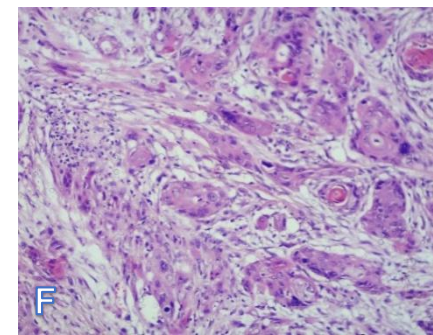
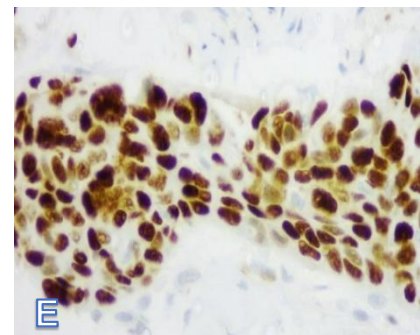
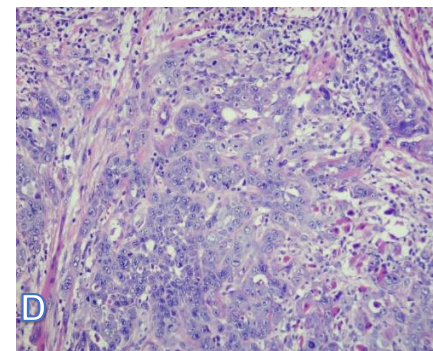
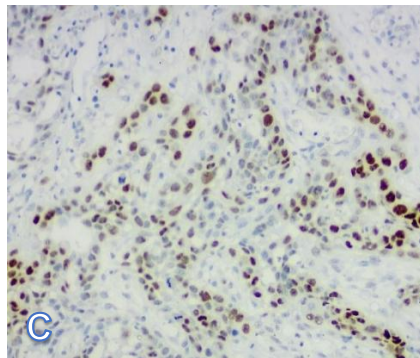
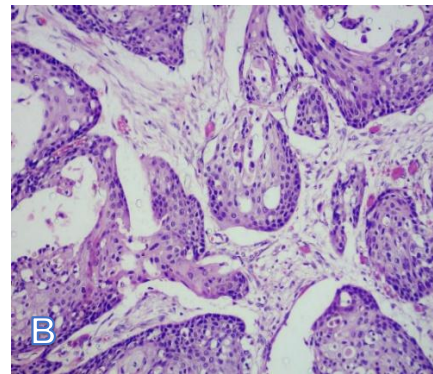
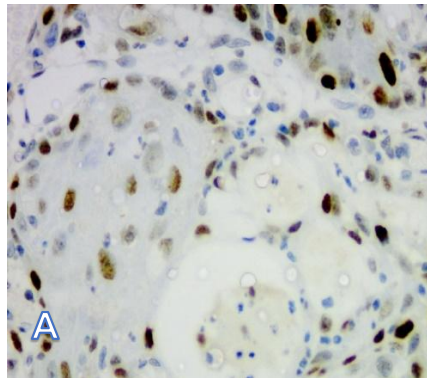


**Figura 32. Proteína p16 (reagente)**

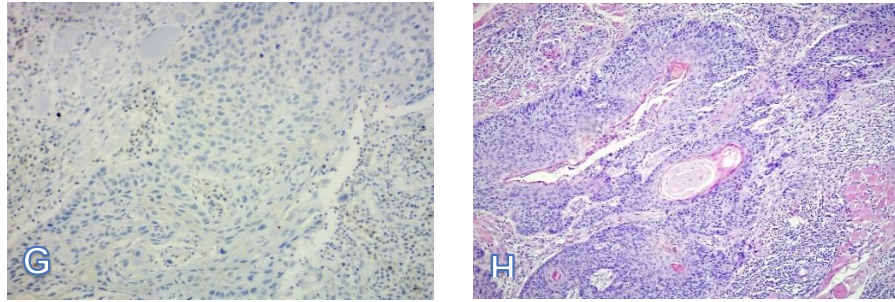


**Figura 33. Colocação do reagente no equipamento Ventana (dispositivo)**

A seguir temos imagens da imunohistoquímica e o H.E. da proteína p53  
Níveis A, B,C e Negativo.



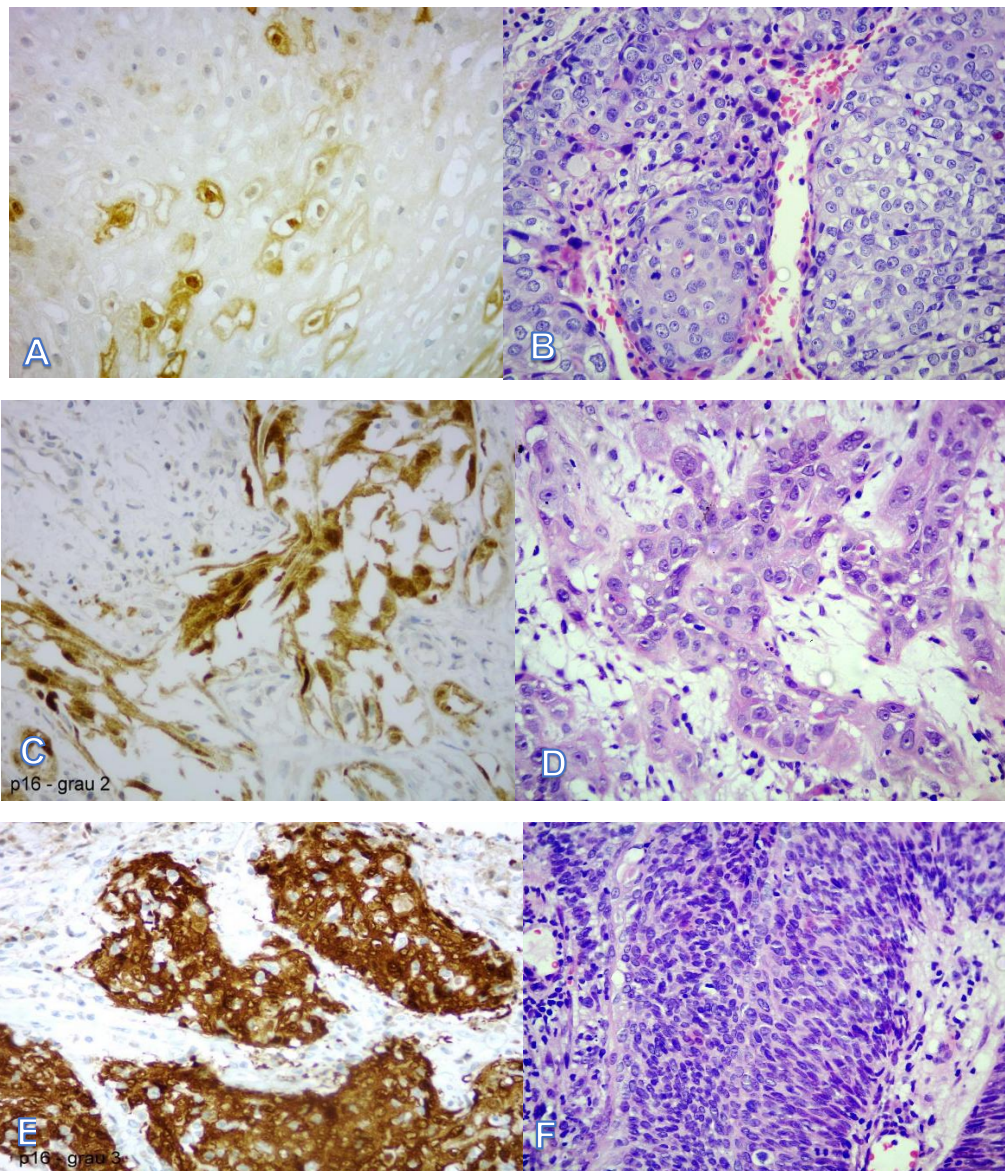




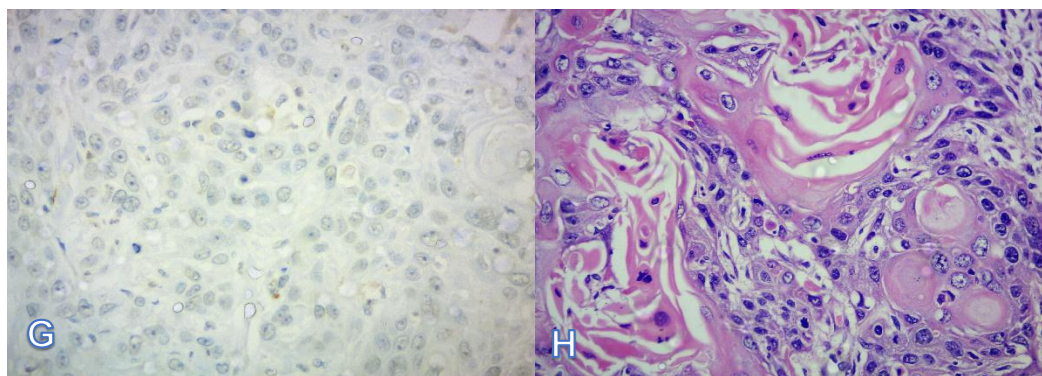
**Figura 34. Microfotografias das proteínas p53 e p53 negativa**

- |                        |   |
|------------------------|---|
| <b>A: p53 nível A</b>  | <b>B: H.E. Carcinoma de células escamosas p53 nível A</b>     |
| <b>C: p53 nível B</b>  | <b>D: H.E. Carcinoma de células escamosas p53 nível B</b>     |
| <b>E: p53 nível C</b>  | <b>F: H.E. Carcinoma de células escamosas p53 nível C</b>     |
| <b>G: p53 negativo</b> | <b>H: H.E. Carcinoma de células escamosas do p53 negativo</b> |

A seguir apresentamos imagens da imunohistoquímica e o H.E. da proteína p16 Graus 1, 2, 3 e Negativo.







**Figura 35. Microfotografias das proteínas p 16 positiva e p16 negativa**

- |                         |   |
|-------------------------|---|
| <b>A: p16 grau 1</b>    | <b>B: H.E. Carcinoma de células escamosas p16 grau 1</b>      |
| <b>C: p16 grau 2</b>    | <b>D: H.E. Carcinoma de células escamosas p16 grau 2</b>      |
| <b>E: p 16 grau 3</b>   | <b>F: H.E. Carcinoma de células escamosas p 16 grau 3</b>     |
| <b>G: p 16 negativo</b> | <b>H: H.E. Carcinoma de células escamosas do p16 negativo</b> |

### 3.4 Metodologia Estatística

Para verificarmos a relação da expressividade das proteínas p53 e p16 com a localização do tumor, estadiamento, disseminação linfonodal, sobrevida e o aspecto de risco ou proteção nos pacientes com carcinoma de células escamosas na cavidade oral, laringe e faringe apresentaremos as variáveis quantitativas pela mediana, 1º e 3º quartil. As variáveis qualitativas serão apresentadas pela frequência absoluta e porcentagem.

Para as comparações entre os grupos utilizaremos o teste t-Student ou o teste de Wilcoxon, dependendo da suposição de normalidade testada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Para verificar associação entre variáveis qualitativas utilizaremos o teste exato de Fisher ou Qui-quadrado. Utilizaremos o estimador de Kaplan-Meier para construção das curvas de sobrevida. Para a comparação entre as curvas utilizaremos o teste de Log-rank. Aplicaremos o modelo de Cox univariado nas variáveis p53 e p16 para verificar se essas são associadas à ocorrência de óbito (geral e pela doença). O nível de significância adotado foi de 5% (Pereira, 2010; Hollander e Chicken, 1973).

Os programas utilizados foram: IMB SPSS 19 (IBM Corp. Released 2010. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 19.0. Armonk, NY: IBM Corp.); R (R: A Language and Environment for Statistical Computing; Vienna, Austria; R Core Team (2018); R Core Team (2018). R: A language and environment for statistical computing; R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Áustria.

## ***4. Resultados***

---

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Cavidade Oral

Na casuística de 69 pacientes com carcinoma de células escamosas na cavidade oral, 51 (73,9%) eram do gênero masculino e 18 (26,1%) do feminino, com a idade média de 60,7 anos e a mediana de 60 anos. 41 (59,4%) pacientes eram tabagistas ativos, 16 (23,2%) eram ex-tabagistas e 12 (17,4%) nunca fumaram. 26 (37,7%) pacientes eram etilistas ativos, 15 (21,7%) eram ex-etilistas e 28 (40,6%) não eram etilistas (40,6%). 65 (94,2%) dos pacientes tinham hábito de beber chimarrão.

No grau de diferenciação do carcinoma de células escamosas, 34 (49,3%) eram carcinomas de células escamosas moderadamente diferenciados, 27 (39,1%) eram carcinomas de células escamosas bem diferenciados e 8 (11,6%) eram carcinomas pouco diferenciados. Assim, temos:

**Tabela 1. Localização na cavidade oral: subsítios**

<b>Localização</b>	<b>N</b>	<b>%</b>	<b>% dos válidos</b>
<b>Língua</b>	<b>31</b>	<b>44,9</b>	<b>44,9</b>
Soalho oral	5	7,2	7,2
Soalho oral + Língua	9	13,0	13,0
Área retro molar	12	17,4	17,4
Mucosa jugal	3	4,3	4,3
Rebordo alveolar	3	4,3	4,3
Palato duro	6	8,7	8,7
Total	69	100,0	100,0

Observamos que em 31 (44,9%) pacientes a localização foi língua, exclusivamente.

**Tabela 2. Relação da frequência da proteína p53 na cavidade oral**

<b>Proteína p53</b>	<b>N</b>	<b>%</b>	<b>% dos válidos</b>
Negativa	21	30,4	30,4
<b>Positiva</b>	<b>48</b>	<b>69,6</b>	<b>69,6</b>
Total	69	100,0	100,0

Observamos que 48 (69,6%) pacientes têm a proteína p53 positiva.

**Tabela 3. Relação do nível de expressividade da proteína p53 na cavidade oral**

<b>Proteína p53</b>	N	%	% dos válidos
Nível A	5	7,2	7,2
Nível B	15	21,7	21,7
<b>Nível C</b>	<b>28</b>	<b>40,6</b>	<b>40,6</b>
Nível Negativo	21	30,4	30,4
Total	69	100,0	100,0

Observamos que 28 (40,6%) pacientes têm a proteína p53 nível C.

**Tabela 4. Em relação a frequência da proteína p16 na cavidade oral**

<b>Proteína p16</b>	N	%	% dos válidos
Negativa	48	69,6	69,6
<b>Positiva</b>	<b>21</b>	<b>30,4</b>	<b>30,4</b>
Total	69	100,0	100,0

Observamos que 21 (30,4%) pacientes têm proteína p16 positiva.

**Tabela 5. Relação do grau da expressividade da proteína p16 na cavidade oral**

<b>Proteína p16</b>	N	%	% dos válidos
Grau 1	12	17,4	17,4
Grau 2	3	4,3	4,3
Grau 3	6	8,7	8,7
<b>Grau 0</b>	<b>48</b>	<b>69,6</b>	<b>69,6</b>
Total	69	100,0	100,0

Observamos que 48 (69,6%) pacientes têm proteína p16 grau 0.

**Tabela 6. Relação cruzada dos níveis e graus entre as proteínas p53 e p16**

p16	Proteína p53												Total		
	Nível A			Nível B			Nível C			Nível Negativo					
	N	% pela linha	% pela coluna	N	% pela linha	% pela coluna	N	% pela linha	% pela coluna	N	% pela linha	% pela coluna	N	% pela linha	% pela coluna
Grau 1	1	8,3%	20,0%	1	8,3%	6,7%	7	58,3%	25,0%	3	25,0%	14,3%	12	100,0%	17,4%
Grau 2	0	0,0%	0,0%	0	0,0%	0,0%	3	100,0%	10,7%	0	0,0%	0,0%	3	100,0%	4,3%
Grau 3	0	0,0%	0,0%	0	0,0%	0,0%	3	50,0%	10,7%	3	50,0%	14,3%	6	100,0%	8,7%
Grau 0	4	8,3%	80,0%	14	29,2%	93,3%	15	31,3%	53,6%	15	31,3%	71,4%	48	100,0%	69,6%
Total	5	7,2%	100,0%	15	21,7%	100,0%	28	40,6%	100,0%	21	30,4%	100,0%	69	100,0%	100,0%

**Tabela 7. Situação das proteínas p53 e p16 e a frequência**

Proteínas p16 e p53	N	%	% dos válidos
<b>p16 (-) e p53 (+)</b>	<b>33</b>	<b>47,8</b>	<b>47,8</b>
p16 (-) e p53 (-)	15	21,7	21,7
p16 (+) e p53 (+)	15	21,7	21,7
p16 (+) e p53 (-)	6	8,7	8,7
Total	69	100,0	100,0

Observamos que 33 (47,8%) pacientes têm proteínas p16 negativa e p53 positiva.

**Tabela 8. Relação da proteína p53 com a idade**

Variável	Proteína p53	Média	Mediana	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	1º Quartil	3º Quartil	P-valor
Idade	Negativa	58,76	58,00	8,20	44,00	78,00	53,00	63,00	0,3340
	Positiva	61,63	60,00	10,51	43,00	90,00	55,00	68,50	

**Tabela 9. Relação da proteína p16 com a idade**

Variável	Proteína p16	Média	Mediana	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	1º Quartil	3º Quartil	P-valor
Idade	Negativa	60,17	59,00	10,46	43,00	90,00	53,00	65,00	0,3307
	Positiva	62,10	60,00	8,54	48,00	79,00	56,00	67,00	

Observamos que não houve diferença significativa entre as positivities das proteínas p53 e p16 em relação à idade.

Tabela 10. Relação da proteína p53 com o gênero

Gênero	Proteína p53				Total	
	Negativa		Positiva			
	N	%	N	%	N	%
<b>Masculino</b>	<b>15</b>	<b>71,4%</b>	<b>36</b>	<b>75,0%</b>	51	73,9%
<b>Feminino</b>	6	28,6%	12	25,0%	18	26,1%
<b>Total</b>	21	100,0%	48	100,0%	69	100,0%

**p-valor = 0,7722**

Observamos que no grupo p53 positivo 36 (75,0%) dos pacientes são do gênero masculino, enquanto que no grupo com p53 negativo temos 15 (71,4%). O valor de  $p = 0,7722$ . Assim, não temos associação estatisticamente significativa entre as variáveis.

Tabela 11. Relação da proteína p53 com a localização na cavidade oral

Localização	Proteína p53				Total	
	Negativa		Positiva			
	N	%	N	%	N	%
Língua	7	33,3%	24	50,0%	31	44,9%
Soalho oral	1	4,8%	4	8,3%	5	7,2%
<b>Soalho oral + Língua</b>	<b>7</b>	<b>33,3%</b>	<b>2</b>	<b>4,2%</b>	<b>9</b>	<b>13,0%</b>
Área retro molar	4	19,0%	8	16,7%	12	17,4%
Mucosa jugal	0	0,0%	3	6,3%	3	4,3%
Rebordo alveolar	0	0,0%	3	6,3%	3	4,3%
Palato duro	2	9,5%	4	8,3%	6	8,7%
Total	21	100,0%	48	100,0%	69	100,0%

**p-valor = 0,0513**

Observamos que no grupo p53 positivo 2 (4,2%) dos pacientes têm a localização soalho oral e língua, enquanto que no grupo com p53 negativo temos 7 (33,3%). O valor de  $p = 0,0513$  (quase significativo). Assim, não temos associação estatisticamente significativa entre as variáveis.

**Tabela 12. Relação da proteína p53 com a localização na língua e/ou soalho oral**

Língua e/ou soalho	Proteína p53				Total	
	Negativa		Positiva			
	N	%	N	%	N	%
Não	6	28,6%	18	37,5%	24	34,8%
<b>Sim</b>	<b>15</b>	<b>71,4%</b>	<b>30</b>	<b>62,5%</b>	<b>45</b>	<b>65,2%</b>
Total	21	100,0%	48	100,0%	69	100,0%
<b>p-valor = 0.5869</b>						

Observamos que no grupo da proteína p53 positiva 30 (62,5%) dos pacientes têm a localização soalho oral e/ou língua, enquanto que no grupo com a proteína p53 negativa temos 15 (71,4%). O valor de  $p = 0,5869$ . Assim, não temos associação estatisticamente significativa entre as variáveis.

**Tabela 13. Relação da proteína p53 com o tratamento**

Tratamento	Proteína p53				Total	
	Negativa		Positiva			
	N	%	N	%	N	%
Cirurgia	8	38,1%	19	39,6%	27	39,1%
Cirurgia + RT +QT	9	42,9%	18	37,5%	27	39,1%
Cirurgia + RT	3	14,3%	6	12,5%	9	13,0%
QT + RT	1	4,8%	5	10,4	6	8.7
Radioterapia exclusiva (palição)	0	0,0%	4	8,3%	4	5,8%
Total	21	100,0%	48	100,0%	69	100,0%
p-valor = 0,7391						

Observamos que no grupo da proteína p53 positiva 19 (39,6%) dos pacientes têm tratamento somente pela cirurgia, enquanto que no grupo com proteína p53 negativa temos 8 (38,1%). O valor de  $p = 0,7391$ . Assim, não temos associação estatisticamente significativa entre as variáveis.

Tabela 14. Relação da proteína p53 com a cirurgia presente no tratamento

Tratamento (ciurgia)	Proteína p53				Total	
	Negativa		Positiva			
	N	%	N	%	N	%
Não	1	4,8%	5	10,4%	6	8,7%
<b>Sim</b>	<b>20</b>	<b>95,2%</b>	<b>43</b>	<b>89,6%</b>	<b>63</b>	<b>91,3%</b>
Total	21	100,0%	48	100,0%	69	100,0%
<b>p-valor = 0.6591</b>						

Observamos que no grupo da proteína p53 positiva 43 (89,6%) dos pacientes têm tratamento por cirurgia somente ou associada à adjuvância com radioterapia e quimioterapia ou radioterapia pós-operatória, enquanto que no grupo com a proteína p53 negativa temos 20 (95,2%). O valor de  $p = 0,6591$ . Assim, não temos associação estatisticamente significativa entre as variáveis.

Tabela 15. Relação da proteína p53 com o estadiamento

Estadio	Proteína p53				Total	
	Negativa		Positiva			
	N	%	N	%	N	%
I II	12	57,1%	21	43,8%	33	47,8%
III IV	9	42,9%	27	56,3%	36	52,2%
Total	21	100,0%	48	100,0%	69	100,0%
p-valor = 0,4326						

Observamos que no grupo da proteína p53 positiva 27 (56,3%) dos pacientes têm estágio tardio III, IV, enquanto que no grupo com a p53 negativa temos 9 (42,9%). O valor de  $p = 0,4326$ . Assim, não temos associação estatisticamente significativa entre as variáveis.

Tabela 16. Relação da proteína p53 com o tumor (T)

Tumor	Proteína p53				Total	
	Negativa		Positiva			
	N	%	N	%	N	%
T1	5	23,8%	15	31,3%	20	29,0%
T2	9	42,9%	17	35,4%	26	37,7%
T3	4	19,0%	11	22,9%	15	21,7%
T4	3	14,3%	5	10,4%	8	11,6%
Total	21	100,0%	48	100,0%	69	100,0%
p-valor = 0,8487						



Observamos que no grupo da proteína p53 positiva 5 (10,4%) dos pacientes têm tumor T4, enquanto que no grupo com a proteína p53 negativa temos 3 (14,3%). O valor de  $p = 0,8487$ . Assim, não temos associação estatisticamente significativa entre as variáveis.

**Tabela 17. Relação da proteína p53 com a disseminação linfonodal**

Linfonodos	Proteína p53				Total	
	Negativa		Positiva			
	N	%	N	%	N	%
Positivo	8	38,1%	25	52,1%	33	47,8%
Negativo	13	61,9%	23	47,9%	36	52,2%
Total	21	100,0%	48	100,0%	69	100,0%

**p-valor = 0,3088**

Observamos que no grupo da proteína p53 positiva 25 (52,1%) pacientes têm linfonodos positivos, enquanto que no grupo com a proteína p53 negativa temos 8 (38,1%). O valor de  $p = 0,3088$ . Assim, não temos associação estatisticamente significativa entre as variáveis.

**Tabela 18. Relação da proteína p53 e o linfonodo (N)**

Linfonodos	Proteína p53				Total	
	Negativa		Positiva			
	N	%	N	%	N	%
N0	13	61,9%	23	47,9%	36	52,2%
N1	2	9,5%	11	22,9%	13	18,8%
N2a	2	9,5%	2	4,2%	4	5,8%
N2b	2	9,5%	10	20,8%	12	17,4%
N2c	2	9,5%	2	4,2%	4	5,8%
Total	21	100,0%	48	100,0%	69	100,0%

**p-valor = 0,3188**

Observamos que no grupo da proteína p53 positiva 2 (4,2%) dos pacientes têm linfonodos N2c, enquanto que no grupo com a p53 negativa temos 2 (9,5%). O valor de  $p = 0,3188$ . Assim, não temos associação estatisticamente significativa entre as variáveis.

Tabela 19. Relação da proteína p53 com a recidiva

Recidiva	Proteína p53				Total	
	Negativa		Positiva			
	N	%	N	%	N	%
Não	12	57,1%	29	60,4%	41	59,4%
Sim	9	42,9%	19	39,6%	28	40,6%
Total	21	100,0%	48	100,0%	69	100,0%
p-valor = 0,7970						

Observamos que no grupo da proteína p53 positiva 29 (60,4%) dos pacientes não tiveram recidiva, enquanto que no grupo com a proteína p53 negativa temos 12 (57,1%). O valor de  $p = 0,7970$ . Assim, não temos associação estatisticamente significativa entre as variáveis.

Tabela 20. Relação da proteína p53 com o óbito geral

Óbito 3ª	Proteína p53				Total	
	Negativa		Positiva			
	N	%	N	%	N	%
Não	17	81,0%	29	60,4%	46	66,7%
<b>Sim</b>	<b>4</b>	<b>19,0%</b>	<b>19</b>	<b>39,6%</b>	23	33,3%
Total	21	100,0%	48	100,0%	69	100,0%

Observamos que 19 (39,6%) dos pacientes com proteína p53 positiva evoluíram para óbito geral *versus* 4 (19%) dos pacientes com proteína p53 negativa evoluíram para óbito geral.

Tabela 21. Relação da proteína p53 com óbito pela doença

Óbito pela doença 3ª	Proteína p53				Total	
	Negativa		Positiva			
	N	%	N	%	N	%
Não	18	85,7%	31	64,6%	49	71,0%
<b>Sim</b>	<b>3</b>	<b>14,3%</b>	<b>17</b>	<b>35,4%</b>	20	29,0%
Total	21	100,0%	48	100,0%	69	100,0%

Observamos que 17 (35,4%) dos pacientes com proteína p53 positiva evoluíram para óbito pela doença *versus* 3 (14,3%) dos pacientes com proteína p53 negativa evoluíram para óbito pela doença.

**Tabela 22. Relação do nível da proteína p53 com o óbito geral**

Obito_3a	Proteína p53								Total	
	Nível A		Nível B		Nível C		Nível Negativo			
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Não	1	20,0%	9	60,0%	19	67,9%	17	81,0%	46	66,7%
<b>Sim</b>	<b>4</b>	<b>80,0%</b>	<b>6</b>	<b>40,0%</b>	<b>9</b>	<b>32,1%</b>	<b>4</b>	<b>19,0%</b>	<b>23</b>	<b>33,3%</b>
Total	5	100,0%	15	100,0%	28	100,0%	21	100,0%	69	100,0%

Observamos 9 (32,1%) dos pacientes com a proteína p53 positiva nível C evoluíram para óbito geral *versus* 4 (19%) dos pacientes com a proteína p53 negativa evoluíram para óbito geral.

**Tabela 23. Relação do nível da proteína p53 com o óbito pela doença**

Óbito pela doença 3a	Proteína p53								Total	
	Nível A		Nível B		Nível C		Nível Negativo			
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Não	1	20,0%	9	60,0%	21	75,0%	18	85,7%	49	71,0%
<b>Sim</b>	<b>4</b>	<b>80,0%</b>	<b>6</b>	<b>40,0%</b>	<b>7</b>	<b>25,0%</b>	<b>3</b>	<b>14,3%</b>	<b>20</b>	<b>29,0%</b>
Total	5	100,0%	15	100,0%	28	100,0%	21	100,0%	69	100,0%

Observamos 7 (25%) dos pacientes com a proteína p53 positiva nível C evoluíram para óbito pela doença *versus* 3 (14,3%) pacientes com a proteína p53 negativa evoluíram para óbito pela doença.

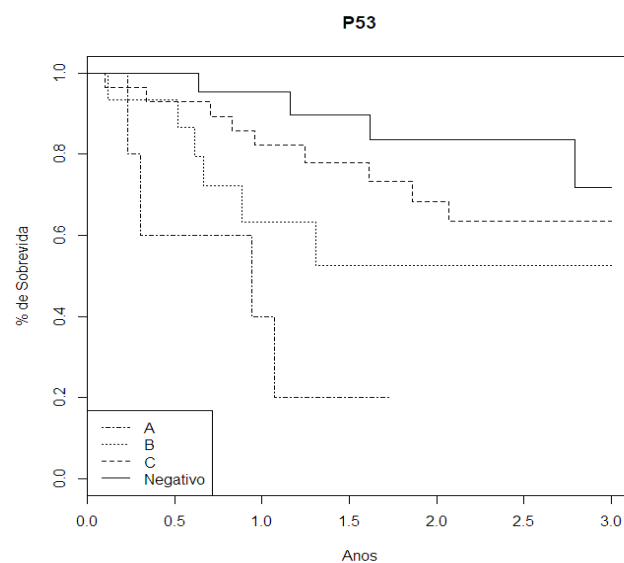
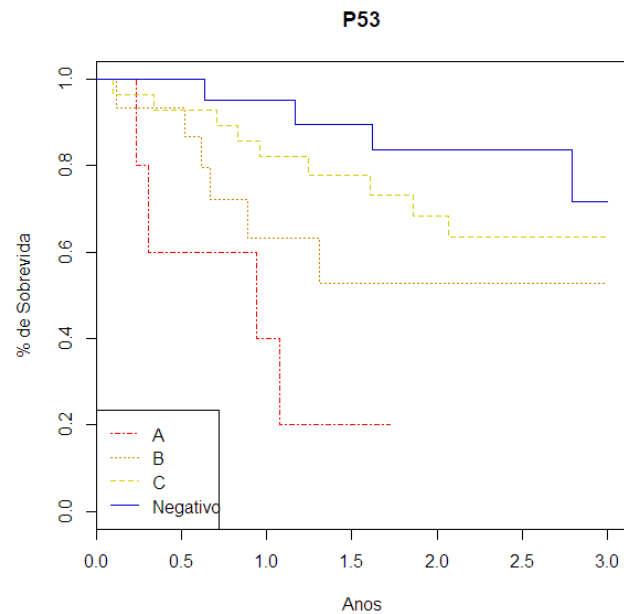
Observação: Nos 28 pacientes com proteína p53 positiva nível C havia 7 (25%) pacientes com proteína p16 positiva grau 1, 3 (10,7%) pacientes com proteína p16 positiva grau 2, 3 (10,7%) pacientes com a proteína p16 positiva grau 3 e 15 (53,6%) pacientes com a proteína p16 grau 0.

Nos 15 pacientes com proteína p53 positiva nível B havia 1 (6,7%) paciente com proteína p16 grau 1 e 14 (93,3%) casos de pacientes com proteína p16 grau 0.

Nos 5 pacientes proteína p53 positiva nível A, havia 1 (20%) paciente com proteína p16 positiva grau 1 e 4 (80%) pacientes com proteína p16 grau 0.

Nos 21 pacientes proteína p53 negativa havia 3 (14,3%) pacientes com proteína p16 positiva grau 1, 0 (0%) paciente com p16 positiva grau 2, 3 (14,3%) pacientes com proteína p16 positiva grau 3 e 15 (71,4%) pacientes p16 grau 0.

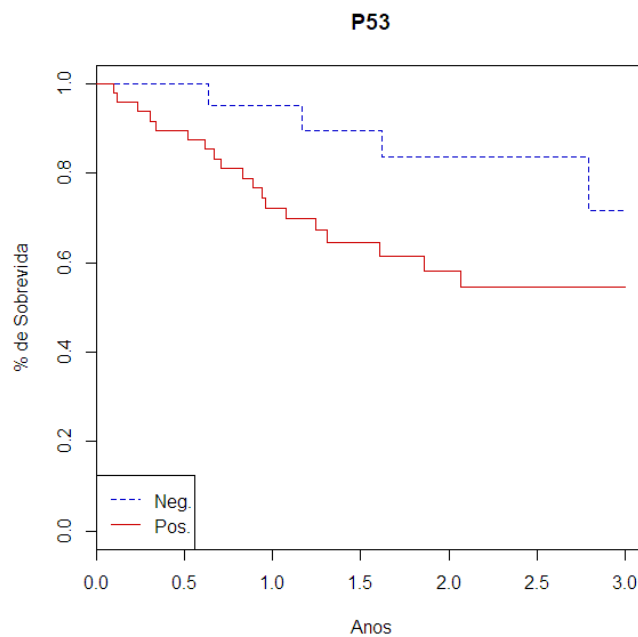
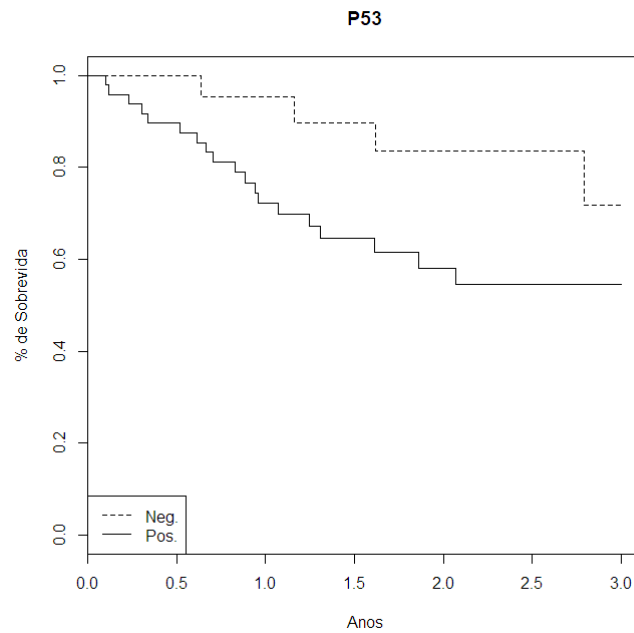
A seguir temos os gráficos com as curvas de sobrevivência para óbito geral, calculadas pelo estimador de Kaplan-Meier para cada nível da proteína p53 (Gráficos 1 e 2).



**Gráficos 1 e 2. Relação do nível da proteína p53 com óbito geral**

Temos que o valor de p para o teste de Log-rank = 0,0031. Assim temos que há diferença entre as curvas de sobrevida. Logo, quanto mais próxima da proteína p53 negativa, maior a sobrevida.

Observando somente proteína p53 positiva e negativa, temos os seguintes gráficos (Gráficos 3 e 4):



**Gráficos 3 e 4. Sobrevida entre pacientes p53 positivo e negativo – óbito geral**

Temos que o valor de p para o teste de Log-rank = 0,0664 (quase significativo). Assim temos que não há diferença entre as curvas de sobrevida.

A seguir temos o modelo de Cox univariado para o p53.

**Tabela 24. Modelo Cox univariado da proteína p53: óbito geral**

Variável	H.R.	IC (95%)		P-valor
		Lim. Inf	Lim. Sup.	
p53 (+)	<b>2,646</b>	0,898	7,795	<b>0,0774</b>

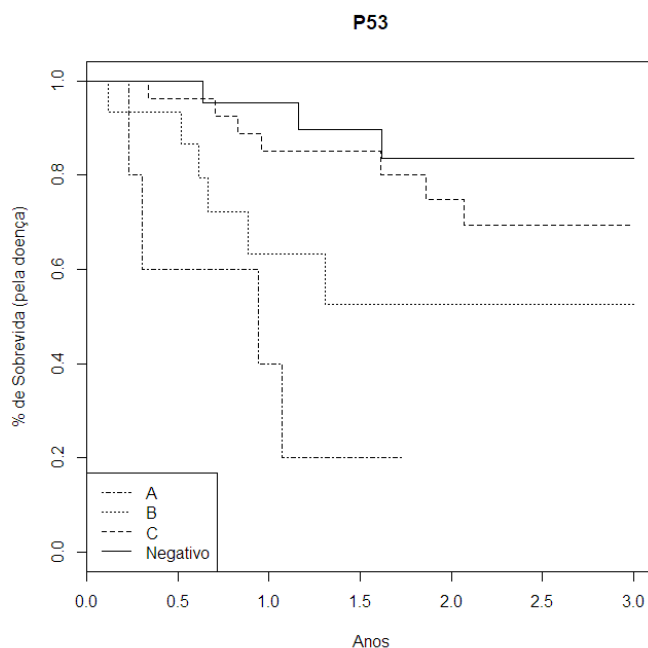
Observamos que o H.R. foi de aproximadamente 2,6. Assim, temos que quem tem p53 positivo tem 2,6 vezes mais chances de evoluir para óbito geral do que os pacientes com proteína p53 negativa. O valor de  $p = 0,0774$  sendo não significativo.

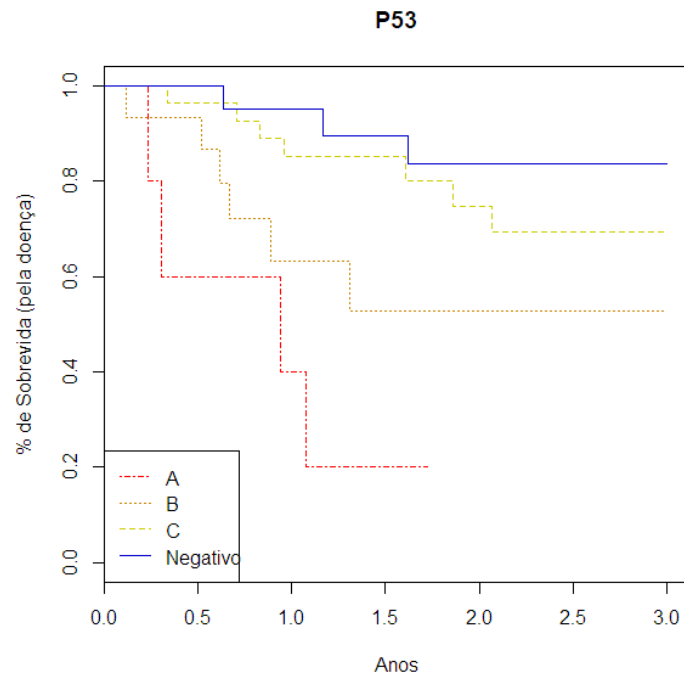
**Tabela 25. Modelo de Cox da proteína p53 ajustado pelo sexo e idade**

Variável	H.R.	IC (95%)		P-valor
		Lim. Inf	Lim. Sup.	
p53 (+)	<b>2,376</b>	0,799	7,069	<b>0,1198</b>

Observamos que o H.R. foi de aproximadamente 2,4. Assim, temos que pacientes com a proteína p53 positiva têm 2,4 vezes mais chances de evoluir para óbito geral do que os pacientes com a proteína p53 negativa. O valor de  $p = 0,1198$  sendo não significativo.

A seguir temos os gráficos com as curvas de sobrevivência para óbito pela doença (Gráficos 5 e 6), calculadas pelo estimador de Kaplan-Meier para cada nível da proteína p53.

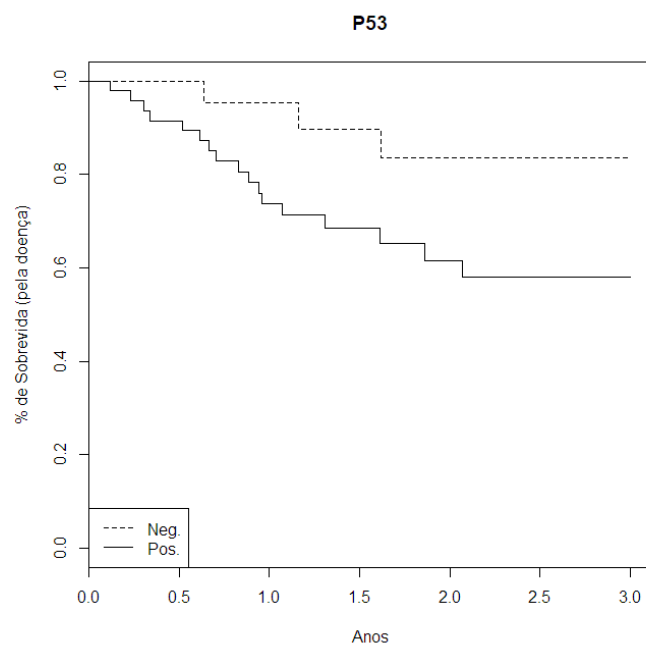


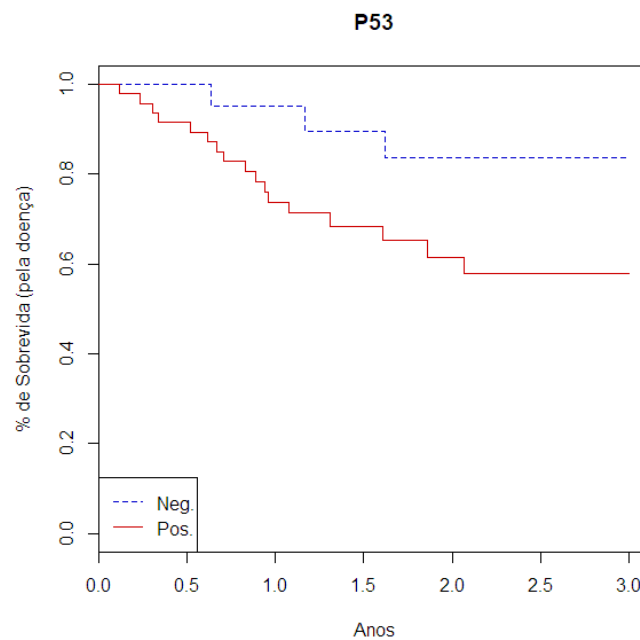


**Gráficos 5 e 6. Relação do nível da proteína p53 com a sobrevida dos pacientes – óbito pela doença**

Temos que o valor de  $p$  para o teste de Log-rank = 0,0006. Assim, temos que há diferença entre as curvas de sobrevida. Logo, quanto mais próxima da proteína p53 negativa, maior a sobrevida.

Observando somente proteína 53 positiva e negativa, temos os Gráficos 7 e 8.





**Gráficos 7 e 8. Relação da sobrevida dos pacientes com a proteína p53 – óbito pela doença**

Temos que o valor de p para o teste de Log-rank = 0,0527 (quase significativo). Assim, temos que não há diferença entre as curvas de sobrevida.

**Tabela 26. Modelo de Cox univariado da proteína p53: óbito pela doença**

Variável	H.R.	IC (95%)		P-valor
		Lim. Inf	Lim. Sup.	
<b>p53 (+)</b>	<b>3,163</b>	0,925	10,815	<b>0,0664</b>

Observamos que o H.R. foi de aproximadamente 3,2. Assim temos que os pacientes com a proteína p53 positiva têm 3,2 vezes mais chances de evoluir para óbito pela doença do que os pacientes com a proteína p53 negativa. O valor de p = 0,0664 sendo não significativo.

**Tabela 27. Modelo de Cox da proteína p53 ajustado pelo sexo e idade**

Variável	H.R.	IC (95%)		P-valor
		Lim. Inf	Lim. Sup.	
<b>p53 (+)</b>	<b>2,789</b>	0,806	9,645	0,1053



Observamos que o H.R. foi de aproximadamente 2,8. Assim temos que os pacientes com a proteína p53 positiva têm 2,8 vezes mais chances de evoluir para óbito pela doença do que os pacientes com a proteína p53 negativa. O valor de  $p = 0,1053$  sendo não significativo.

#### 4.1.1 Em relação à proteína p16

**Tabela 28. Relação da proteína p16 com o gênero**

Gênero	Proteína p16				Total	
	Negativa		Positiva			
	N	%	N	%	N	%
Masculino	35	72,9%	16	76,2%	51	73,9%
Feminino	13	27,1%	5	23,8%	18	26,1%
Total	48	100,0%	21	100,0%	69	100,0%
p-valor = 1.0000						

Observamos que no grupo da proteína p16 positiva 16 (76,2%) dos pacientes são do gênero masculino, enquanto que no grupo com a proteína p16 negativa temos 35 (72,9%). O valor de  $p = 1,0000$ . Assim, não temos associação estatisticamente significativa entre as variáveis.

**Tabela 29. Relação da proteína p16 com a localização na cavidade oral**

Localização	Proteína p16				Total	
	Negativa		Positiva			
	N	%	N	%	N	%
Língua	23	47,9%	8	38,1%	31	44,9%
Soalho oral	5	10,4%	0	0,0%	5	7,2%
<b>Soalho oral + Língua</b>	<b>8</b>	<b>16,7%</b>	<b>1</b>	<b>4,8%</b>	<b>9</b>	13,0%
Área retro molar	3	6,3%	9	42,9%	12	17,4%
Mucosa jugal	1	2,1%	2	9,5%	3	4,3%
Rebordo alveolar	2	4,2%	1	4,8%	3	4,3%
Palato duro	6	12,5%	0	0,0%	6	8,7%
Total	48	100,0%	21	100,0%	69	100,0%

**p-valor = 0,0015**

Observamos que no grupo dos pacientes com a proteína p16 positiva 1 (4,8%) dos pacientes tem localização no soalho oral e língua, enquanto que no grupo com a

proteína p16 negativa temos 8 (16,7%). O valor de  $p = 0,0015$ . Assim, temos associação estatisticamente significativa entre as variáveis.

**Tabela 30. Relação da proteína p16 com a localização na língua e/ou soalho oral**

Língua e/ou soalho	Proteína p16				Total	
	Negativa		Positiva			
	N	%	N	%	N	%
Não	12	25,0%	12	57,1%	24	34,8%
<b>Sim</b>	<b>36</b>	<b>75,0%</b>	<b>9</b>	<b>42,9%</b>	<b>45</b>	<b>65,2%</b>
Total	48	100,0%	21	100,0%	69	100,0%

**p-valor = 0,0140**

Observamos que no grupo dos pacientes com a proteína p16 positiva 9 (42,9%) dos pacientes têm localização no soalho oral e/ou língua, enquanto que no grupo dos pacientes com a proteína p16 negativa temos 36 (75,0%). O valor de  $p$  foi de 0,0140. Assim, temos associação estatisticamente significativa entre as variáveis.

**Tabela 31. Relação da proteína p16 com o tratamento**

Tratamento	Proteína p16				Total	
	Negativa		Positiva			
	N	%	N	%	N	%
Cirurgia	18	37,5%	9	42,9%	27	39,1%
Cirurgia + RT +QT	19	39,6%	8	38,1%	27	39,1%
Cirurgia + RT	6	12,5%	3	14,3%	9	13,0%
QT+ RT	2	4,2%	0	0,0%	2	2,9%
Radioterapia	3	6,3%	1	4,8%	4	5,8%
Total	48	100,0%	21	100,0%	69	100,0%

**p-valor = 1,0000**

Observamos que no grupo dos pacientes com a proteína p16 positiva 9 (42,9%) dos pacientes têm tratamento por cirurgia exclusivamente, enquanto que no grupo dos pacientes com a proteína p16 negativa temos 18 (37,5%). O valor de  $p = 1,0000$ . Assim, não temos associação estatisticamente significativa entre as variáveis.

**Tabela 32. Relação da proteína p16 com a cirurgia no tratamento**

Tratamento (cirurgia)	Proteína p16				Total	
	Negativa		Positiva			
	N	%	N	%	N	%
<b>Não</b>	5	10,4%	1	4,8%	6	8,7%
<b>Sim</b>	<b>43</b>	<b>89,6%</b>	<b>20</b>	<b>95,2%</b>	<b>63</b>	<b>91,3%</b>
<b>Total</b>	48	100,0%	21	100,0%	69	100,0%

**p-valor = 0,6591**

Observamos que no caso dos pacientes com a proteína p16 positiva 20 (95,2%) dos pacientes têm tratamento por cirurgia, enquanto que no grupo dos pacientes com a proteína p16 negativa temos 43 (89,6%). O valor de  $p = 0,6591$ . Assim, não temos associação estatisticamente significativa entre as variáveis.

**Tabela 33. Relação da proteína p16 com o estadiamento**

Estadio	Proteína p16				Total	
	Negativa		Positiva			
	N	%	N	%	N	%
<b>I II</b>	24	50,0%	9	42,9%	33	47,8%
<b>III IV</b>	<b>24</b>	<b>50,0%</b>	<b>12</b>	<b>57,1%</b>	<b>36</b>	<b>52,2%</b>
<b>Total</b>	48	100,0%	21	100,0%	69	100,0%

**p-valor = 0,6116**

Observamos que no grupo dos pacientes com a proteína p16 positiva 12 (57,1%) dos pacientes têm estágio III, IV, enquanto que no grupo de pacientes com a proteína p16 negativa temos 24 (50,0%). O valor de  $p = 0,6116$ . Assim, não temos associação estatisticamente significativa entre as variáveis.

**Tabela 34. Relação da proteína p16 com o tumor (T)**

Tumor	Proteína p16				Total	
	Negativo		Positivo			
	N	%	N	%	N	%
<b>T1</b>	15	31,3%	5	23,8%	20	29,0%
<b>T2</b>	16	33,3%	10	47,6%	26	37,7%
<b>T3</b>	12	25,0%	3	14,3%	15	21,7%
<b>T4</b>	<b>5</b>	<b>10,4%</b>	<b>3</b>	<b>14,3%</b>	<b>8</b>	<b>11,6%</b>
<b>Total</b>	48	100,0%	21	100,0%	69	100,0%

**p-valor = 0,5578**

Observamos que no grupo de pacientes com a proteína p16 positiva 3 (14,3%) dos pacientes têm tumor T4, enquanto que no grupo dos pacientes com a proteína p16 negativa temos 5 (10,4%). O valor de  $p = 0,5578$ . Assim, não temos associação estatisticamente significativa entre as variáveis.

**Tabela 35. Relação da proteína p16 com a disseminação linfonodal**

Linfonodos	Proteína p16				Total	
	Negativa		Positiva			
	N	%	N	%	N	%
Positivo	21	43,8%	12	57,1%	33	47,8%
Negativo	27	56,3%	9	42,9%	36	52,2%
Total	48	100,0%	21	100,0%	69	100,0%
p-valor = 0.4326						

Observamos que no grupo dos pacientes com a proteína p16 positiva 12 (57,1%) dos pacientes têm linfonodos positivos, enquanto que no grupo de pacientes com a proteína p16 negativa temos 21 (43,8%). O valor de  $p = 0,4326$ . Assim, não temos associação estatisticamente significativa entre as variáveis.

**Tabela 36. Relação da proteína p16 com o linfonodo (N)**

Linfonodos	Proteína p16				Total	
	Negativa		Positiva			
	N	%	N	%	N	%
N0	27	56,3%	9	42,9%	36	52,2%
N1	6	12,5%	7	33,3%	13	18,8%
N2a	3	6,3%	1	4,8%	4	5,8%
N2b	8	16,7%	4	19,0%	12	17,4%
N2c	4	8,3%	0	0,0%	4	5,8%
Total	48	100,0%	21	100,0%	69	100,0%

p-valor = 0.2391

Observamos que no grupo dos pacientes com a proteína p16 positiva 0 (0,0%) dos pacientes têm linfonodos N2c, enquanto que no grupo dos pacientes com a proteína p16 negativa temos 4 (8,3%). O valor de  $p = 0,2391$ . Assim, não temos associação estatisticamente significativa entre as variáveis.

Tabela 37. Relação da proteína p16 com a recidiva

Recidiva	Proteína p16				Total	
	Negativa		Positiva			
	N	%	N	%	N	%
Não	25	52,1%	16	76,2%	41	59,4%
Sim	23	47,9%	5	23,8%	28	40,6%
Total	48	100,0%	21	100,0%	69	100,0%
p-valor = 0,0692						

Observamos que no grupo dos pacientes com a proteína p16 positiva 16 (76,2%) dos pacientes não tiveram recidiva, enquanto que no grupo dos pacientes com proteína p16 negativa temos 25 (52,1%). O valor de  $p = 0,0692$ . Assim, não temos associação estatisticamente significativa entre as variáveis.

Tabela 38. Relação da proteína p16 com o óbito geral

Óbito 3a	Proteína p16				Total	
	Negativa		Positiva			
	N	%	N	%	N	%
Não	31	64,6%	15	71,4%	46	66,7%
Sim	17	35,4%	6	28,6%	23	33,3%
Total	48	100,0%	21	100,0%	69	100,0%

Observamos que 17 (35,4%) pacientes com proteína p16 negativa evoluíram para óbito geral *versus* 6 (28,6%) dos pacientes com proteína p16 positiva evoluíram para óbito geral.

Tabela 39. Relação da proteína p16 com óbito pela doença

Óbito pela doença 3a	Proteína p16				Total	
	Negativa		Positiva			
	N	%	N	%	N	%
Não	33	68,8%	16	76,2%	49	71,0%
<b>Sim</b>	<b>15</b>	<b>31,3%</b>	<b>5</b>	<b>23,8%</b>	<b>20</b>	<b>29,0%</b>
Total	48	100,0%	21	100,0%	69	100,0%

Observamos que 15 (31,3%) dos pacientes com p16 negativa evoluíram para óbito pela doença *versus* 5 (23,8%) dos pacientes com a proteína p16 positiva evoluíram para óbito pela doença.

**Tabela 40. Relação do grau da proteína p16 com o óbito geral**

Óbito_3 <sup>a</sup>	Proteína p16								Total	
	Grau 1		Grau 2		Grau 3		Grau 0			
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Não	6	50,0%	3	100,0%	6	100,0%	31	64,6%	46	66,7%
<b>Sim</b>	<b>6</b>	<b>50,0%</b>	<b>0</b>	<b>0,0%</b>	<b>0</b>	<b>0,0%</b>	<b>17</b>	<b>35,4%</b>	<b>23</b>	<b>33,3%</b>
Total	12	100,0%	3	100,0%	6	100,0%	48	100,0%	69	100,0%

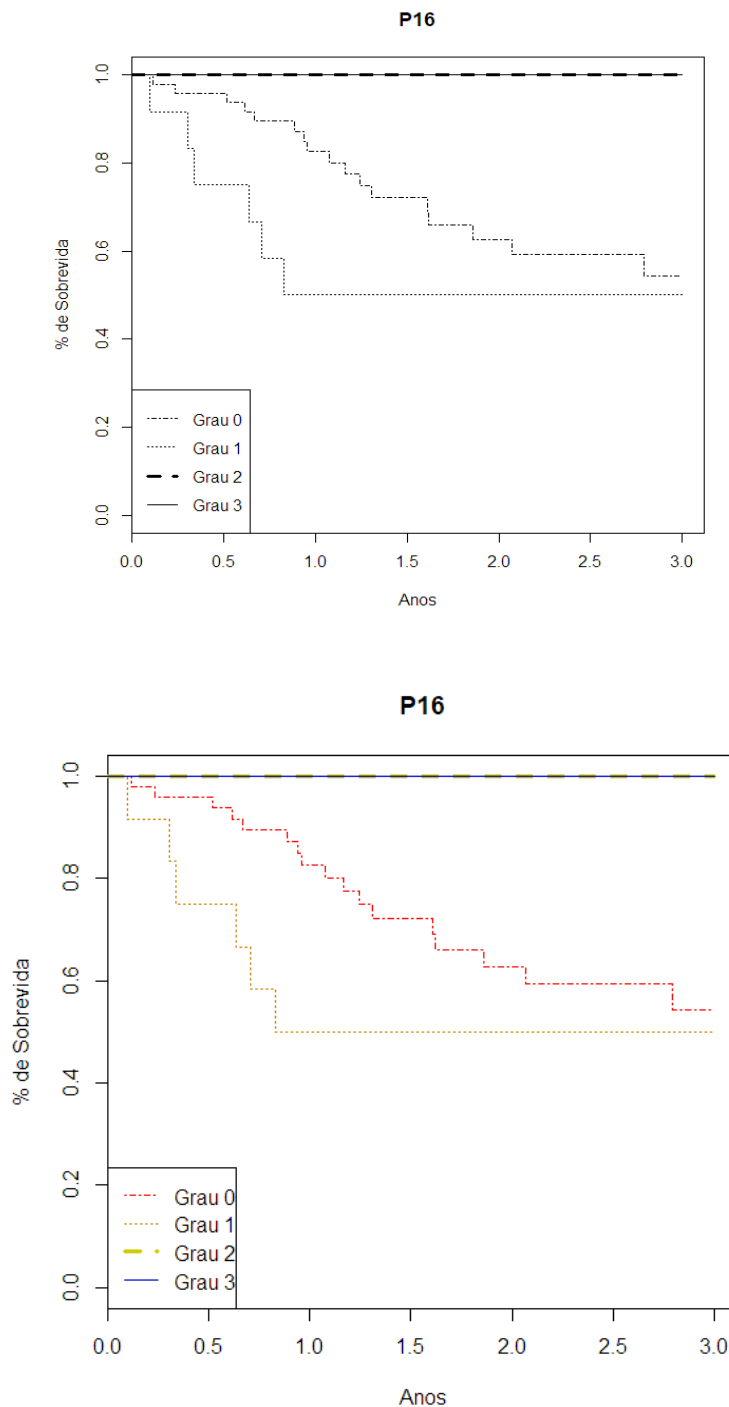
Observamos que 17 (35,4%) dos pacientes com proteína p16 grau 0 evoluíram para óbito geral *versus* 6 (50%) dos pacientes com proteína p16 positiva grau 1 evoluíram para óbito geral.

**Tabela 41. Relação do grau da proteína p16 com óbito pela doença**

Óbito pela doença 3 <sup>a</sup>	Proteína p16								Total	
	Grau 1		Grau 2		Grau 3		Grau 0			
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Não	7	58,3%	3	100,0%	6	100,0%	33	68,8%	49	71,0%
<b>Sim</b>	<b>5</b>	<b>41,7%</b>	<b>0</b>	<b>0,0%</b>	<b>0</b>	<b>0,0%</b>	<b>15</b>	<b>31,3%</b>	<b>20</b>	<b>29,0%</b>
Total	12	100,0%	3	100,0%	6	100,0%	48	100,0%	69	100,0%

Observamos 15 (31,3%) dos pacientes com proteína p16 grau 0 evoluíram para óbito pela doença *versus* 5 (41,7%) dos pacientes com proteína p16 positiva grau 1 evoluíram para óbito pela doença.

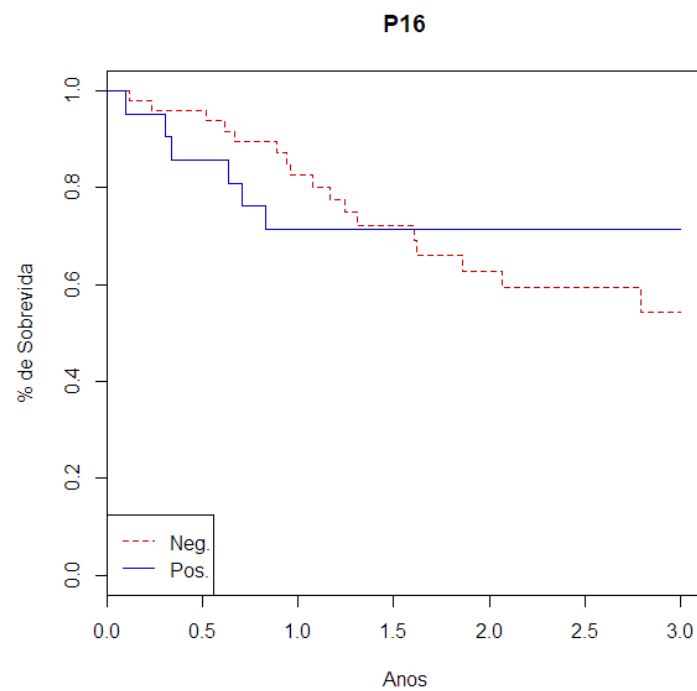
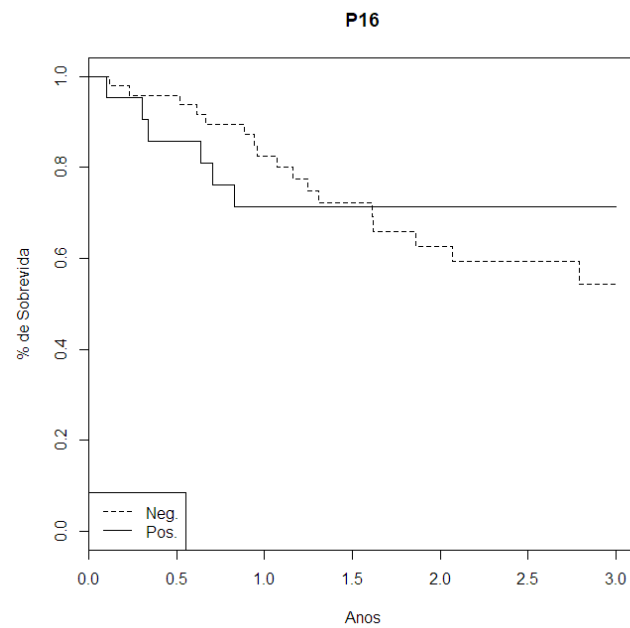
A seguir temos os gráficos com as curvas de sobrevivência para óbito geral, calculadas pelo estimador de Kaplan-Meier para cada grau da proteína p16 (Gráficos 9 e 10).



**Gráficos 9 e 10. Relação do grau da proteína p16 com a sobrevida dos pacientes – óbito geral**

Temos que o valor de p para o teste de Log-rank = 0,0858. Assim temos que não há diferença entre as curvas de sobrevida.

Observando somente a proteína p16 positiva e negativa, temos os seguintes gráficos (Gráficos 11 e 12):



**Gráficos 11 e 12. Relação da sobrevida dos pacientes com a proteína p16 – óbito geral**

Temos que o valor de p para o teste de Log-rank = 0,6237. Assim, temos que não há diferença entre as curvas de sobrevida.

A seguir temos o modelo de Cox univariado para o p16.



**Tabela 42. Modelo de Cox univariado para a proteína p16: óbito geral**

Variável	H.R.	IC (95%)		P-valor
		Lim. Inf	Lim. Sup.	
<b>p16 (+)</b>	<b>0,792</b>	<b>0,312</b>	<b>2,012</b>	<b>0,6245</b>

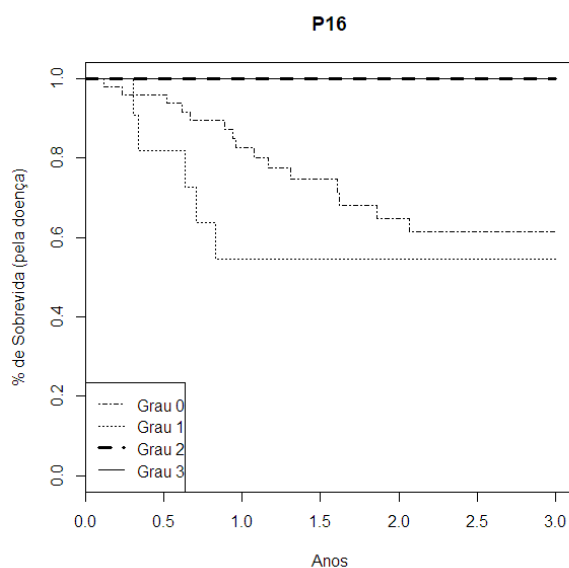
Observamos que o H.R. foi de aproximadamente 0,8. Assim, temos que pacientes com a proteína p16 positiva tem 0,8 vezes mais chances de evoluir para óbito geral do que os pacientes com a proteína p16 negativa. O valor de p foi de 0,6245 sendo não significativo.

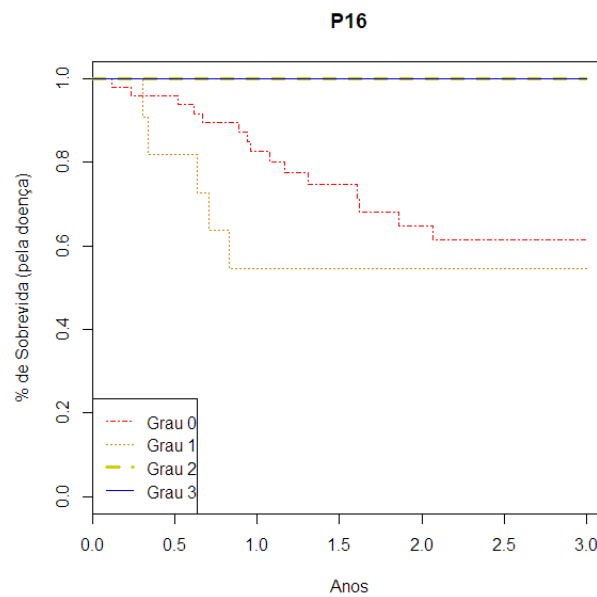
**Tabela 43. Modelo de Cox da proteína p16 ajustado pelo sexo e idade**

Variável	H.R.	IC (95%)		P-valor
		Lim. Inf	Lim. Sup.	
<b>p16 (+)</b>	<b>0,670</b>	<b>0,258</b>	<b>1,741</b>	<b>0,4110</b>

Observamos que o H.R. foi de aproximadamente 0,7. Assim, temos que pacientes com a proteína p16 positiva tem 0,7 vezes mais chances de evoluir para óbito do que os pacientes com a proteína p16 negativa. O valor de p = 0,4110 sendo não significativo.

A seguir temos os gráficos com as curvas de sobrevivência para óbito pela doença, calculadas pelo estimador de Kaplan-Meier para cada grau da proteína p16 (Gráficos 13 e 14).

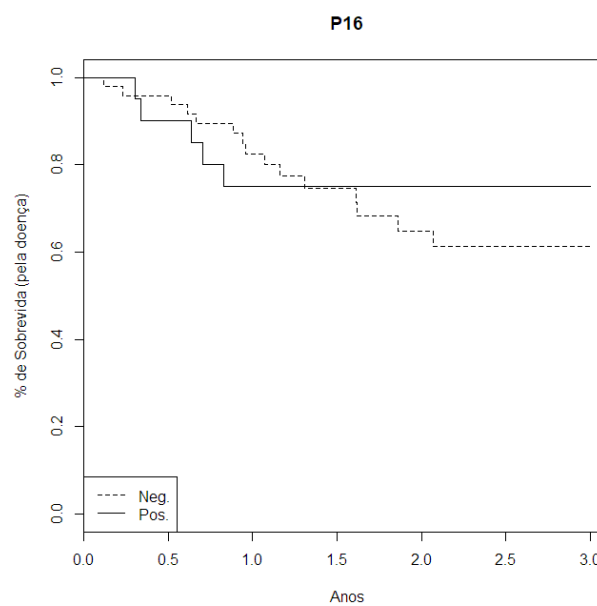


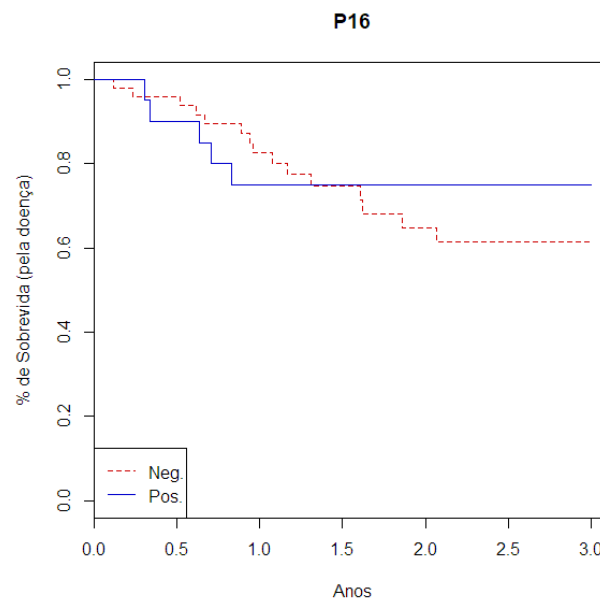


**Gráficos 13 e 14. Relação do grau da proteína p16 com a sobrevida dos pacientes – óbito pela doença**

Temos que o valor de  $p$  para o teste de Log-rank = 0,1487. Assim, temos que não há diferença entre as curvas de sobrevida.

Observando somente a proteína p16 positiva ou negativa, temos os Gráficos 15 e 16.





**Gráficos 15 e 16. Relação da sobrevivida dos pacientes com proteína p16 – óbito pela doença**

Temos que o valor de  $p$  para o teste de Log-rank = 0,5784. Assim, temos que não há diferença entre as curvas de sobrevivida.

A seguir temos o modelo de Cox univariado para o p16.

**Tabela 44. Modelo de Cox univariado da proteína p16: óbito pela doença**

Variável	H.R.	IC (95%)		P-valor
		Lim. Inf	Lim. Sup.	
<b>p16 (+)</b>	<b>0,751</b>	<b>0,272</b>	<b>2,069</b>	<b>0,5797</b>

Observamos que o H.R. foi de aproximadamente 0,7. Assim temos que pacientes com a proteína p16 positiva têm 0,7 vezes mais chances de evoluir para óbito pela doença do que os pacientes com a proteína p16 negativa. O valor de  $p=0,5797$  sendo não significativo.

**Tabela 45. Modelo de Cox ajustado pelo sexo e idade**

Variável	H.R.	IC (95%)		P-valor
		Lim. Inf	Lim. Sup.	
<b>p16 (+)</b>	<b>0,622</b>	<b>0,220</b>	<b>1,758</b>	<b>0,3702</b>

Observamos que o H.R. foi de aproximadamente 0,6. Assim temos que pacientes com a proteína p16 positiva têm 0,6 vezes mais chances de evoluir para

óbito pela doença do que os pacientes com proteína p16 negativa. O valor de p foi de 0,3702 sendo não significativo.

#### 4.1.2 Aspectos das Proteínas p53 e p16 isoladas ou associadas

**Tabela 46. Relação das proteínas p53 e/ou p16 associadas com a localização**

Língua e/ou soalho	Proteínas p53, p16								Total	
	p53 (+) e p16 (-)		p53 (-) e p16 (-)		p53 (+) e p16 (+)		p53 (-) e p16 (+)			
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
<b>Não</b>	10	30,3%	<b>2</b>	<b>13,3%</b>	8	53,3%	4	66,7%	24	34,8%
<b>Sim</b>	23	69,7%	<b>13</b>	<b>86,7%</b>	7	46,7%	2	33,3%	45	65,2%
Total	33	100,0%	<b>15</b>	<b>100,0%</b>	15	100,0%	6	100,0%	69	100,0%

**p-valor = 0,0431**

O valor de p foi de 0,0431. Assim, temos associação estatisticamente significativa entre as variáveis. O grupo p53 negativo e p16 negativo tem mais língua e/ou soalho.

**Tabela 47. Relação das proteínas p53 e/ou p16 com o estadiamento**

Estadio	Proteínas p53, p16								Total	
	p53 (+) e p16 (-)		p53 (-) e p16 (-)		p53 (+) e p16 (+)		p53 (-) e p16 (+)			
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
<b>I II</b>	15	45,5%	9	60,0%	6	40,0%	3	50,0%	33	47,8%
<b>II IV</b>	18	54,5%	6	40,0%	9	60,0%	3	50,0%	36	52,2%
Total	33	100,0%	15	100,0%	15	100,0%	6	100,0%	69	100,0%

**p-valor = 0,7541**

O valor de p = 0,7541. Assim, não temos associação estatisticamente significativa entre as variáveis.

Tabela 48. Relação da proteína p53 e/ou p16 com o tumor (T)

Tumor	Proteínas p53, p16								Total	
	p53 (+) e p16 (-)		p53 (-) e p16 (-)		p53 (+) e p16 (+)		p53 (-) e p16 (+)		N	%
	N	%	N	%	N	%	N	%		
T1	10	30,3%	5	33,3%	5	33,3%	0	0,0%	20	29,0%
T2	12	36,4%	4	26,7%	5	33,3%	5	83,3%	26	37,7%
T3	8	24,2%	4	26,7%	3	20,0%	0	0,0%	15	21,7%
T4	3	9,1%	2	13,3%	2	13,3%	1	16,7%	8	11,6%
Total	33	100,0%	15	100,0%	15	100,0%	6	100,0%	69	100,0%

p-valor = 0,5888

O valor de  $p = 0,5888$ . Assim, não temos associação estatisticamente significativa entre as variáveis.

Tabela 49. Relação das proteínas p53 e/ou p16 com a disseminação linfonodal

Linfonodos	Proteínas p53, p16								Total	
	p53 (+) e p16 (-)		p53 (-) e p16 (-)		p53 (+) e p16 (+)		p53 (-) e p16 (+)		N	%
	N	%	N	%	N	%	N	%		
Positivo	16	48,5%	5	33,3%	9	60,0%	3	50,0%	33	47,8%
Negativo	17	51,5%	10	66,7%	6	40,0%	3	50,0%	36	52,2%
Total	33	100,0%	15	100,0%	15	100,0%	6	100,0%	69	100,0%

p-valor = 0,5533

O valor de  $p = 0,5533$ . Assim, não temos associação estatisticamente significativa entre as variáveis.

Tabela 50. Relação das proteínas p53 e/ou p16 com o linfonodo (N)

Linfonodos	Proteínas p53, p16								Total	
	P53 (+) e P16 (-)		P53 (-) e P16 (-)		P53 (+) e P16 (+)		P53 (-) e P16 (+)		N	%
	N	%	N	%	N	%	N	%		
N0	17	51,5%	10	66,7%	6	40,0%	3	50,0%	36	52,2%
N1	6	18,2%	0	0,0%	5	33,3%	2	33,3%	13	18,8%
N2a	2	6,1%	1	6,7%	0	0,0%	1	16,7%	4	5,8%
N2b	6	18,2%	2	13,3%	4	26,7%	0	0,0%	12	17,4%
N2c	2	6,1%	2	13,3%	0	0,0%	0	0,0%	4	5,8%
Total	33	100,0%	15	100,0%	15	100,0%	6	100,0%	69	100,0%

p-valor = 0,2667

O valor de  $p = 0,2667$ . Assim, não temos associação estatisticamente significativa entre as variáveis.

**Tabela 51. Relação das proteínas p53 e/ou p16 com a recidiva**

Recidiva	Proteínas p53, p16								Total	
	P53 (+) e P16 (-)		P53 (-) e P16 (-)		P53 (+) e P16 (+)		P53 (-) e P16 (+)			
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Não	17	51,5%	8	53,3%	12	80,0%	4	66,7%	41	59,4%
Sim	16	48,5%	7	46,7%	3	20,0%	2	33,3%	28	40,6%
Total	33	100,0%	15	100,0%	15	100,0%	6	100,0%	69	100,0%

**p-valor = 0,2735**

O valor de  $p = 0,2735$ . Desse modo, não temos associação estatisticamente significativa entre as variáveis.

**Tabela 52. Relação das proteínas p53 e/ou p16 com o óbito geral**

Óbito_3ª	Proteínas p53, p16								Total	
	P53 (+) e P16 (-)		P53 (-) e P16 (-)		P53 (+) e P16 (+)		P53 (-) e P16 (+)			
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Não	19	57,6%	12	80,0%	10	66,7%	5	83,3%	46	66,7%
Sim	14	42,4%	3	20,0%	5	33,3%	1	16,7%	23	33,3%
Total	33	100,0%	15	100,0%	15	100,0%	6	100,0%	69	100,0%

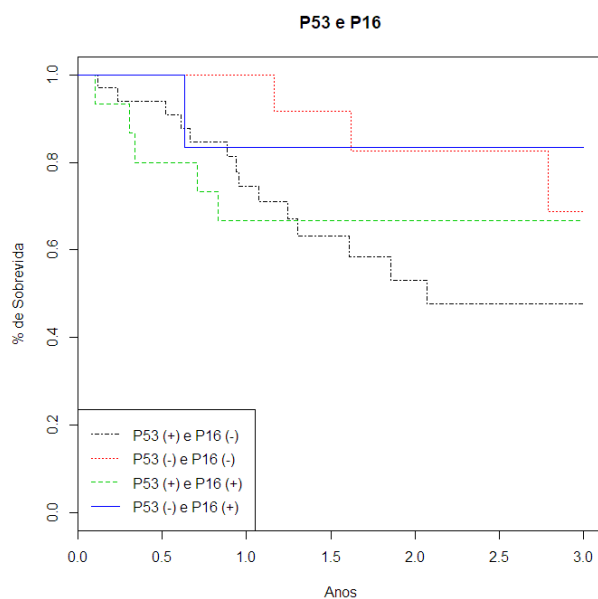
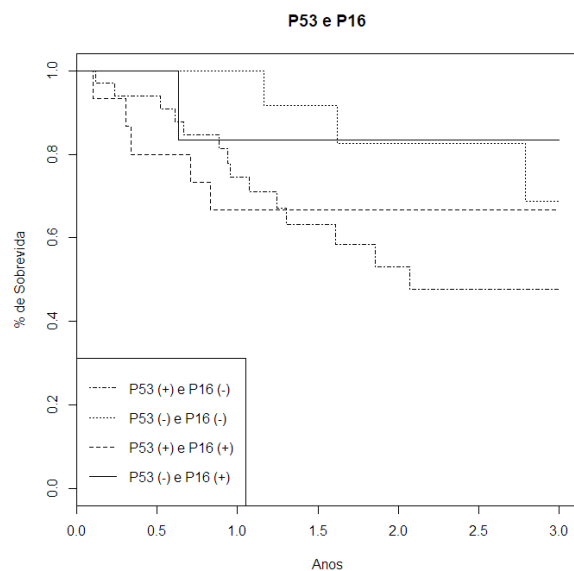
Observamos que 1 (16,7%) paciente com a proteína p16 positiva e a proteína p53 negativa foi ao óbito geral *versus* 14 (42,4%) pacientes com proteína p53 positiva e proteína p16 negativa foram ao óbito geral.

**Tabela 53. Relação das proteínas p53 e/ou p15 com o óbito pela doença**

Óbito pela doença 3ª	Proteínas p53, p16								Total	
	P53 (+) e P16 (-)		P53 (-) e P16 (-)		P53 (+) e P16 (+)		P53 (-) e P16 (+)			
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Não	20	60,6%	13	86,7%	11	73,3%	5	83,3%	49	71,0%
Sim	13	39,4%	2	13,3%	4	26,7%	1	16,7%	20	29,0%
Total	33	100,0%	15	100,0%	15	100,0%	6	100,0%	69	100,0%

Observamos que 1 (16,7%) pacientes com a proteína p53 negativa e a proteína p16 positiva foi ao óbito pela doença *versus* 13 (39,4%) pacientes com a proteína p53 positiva e a proteína p16 negativa foram ao óbito pela doença.

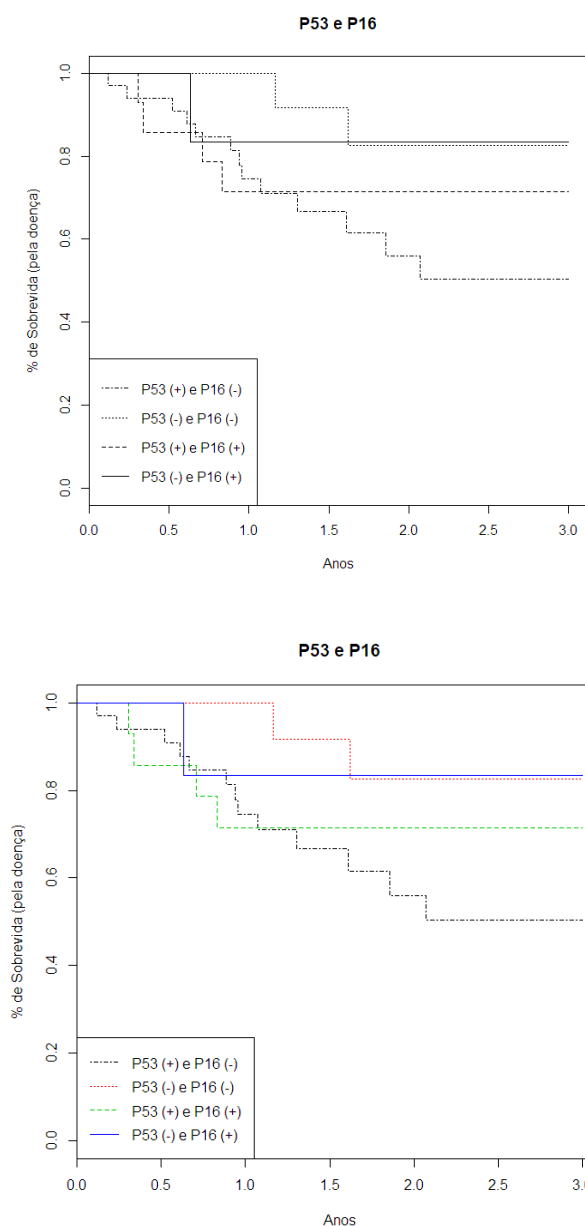
A seguir temos os gráficos com as curvas de sobrevivência para óbito geral, calculadas pelo estimador de Kaplan-Meier para cada categoria das proteínas p53 e p16 (Gráficos 17 e 18).



**Gráficos 17 e 18. Sobrevida dos pacientes com as proteínas p53 positiva e/ou p16 – óbito geral**

Temos que o valor de p para o teste de Log-rank = 0,2849. Assim, temos que não há diferença entre as curvas de sobrevida.

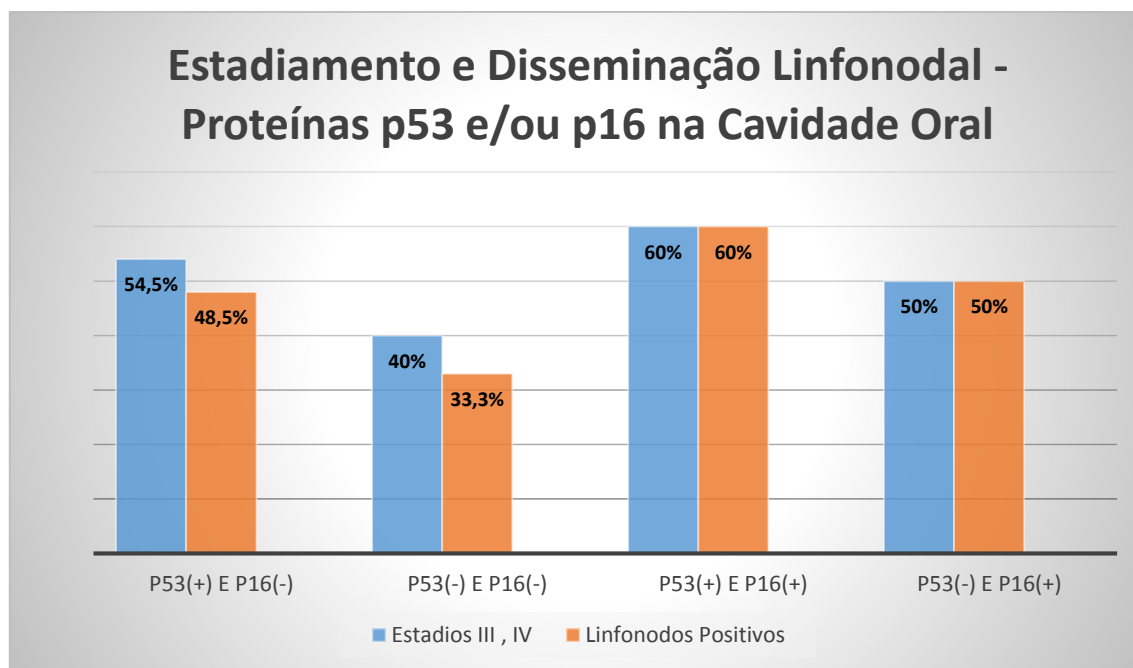
A seguir temos os Gráficos 19 e 20, com as curvas de sobrevivência para óbito pela doença, calculadas pelo estimador de Kaplan-Meier para cada categoria das proteínas p53 e p16.



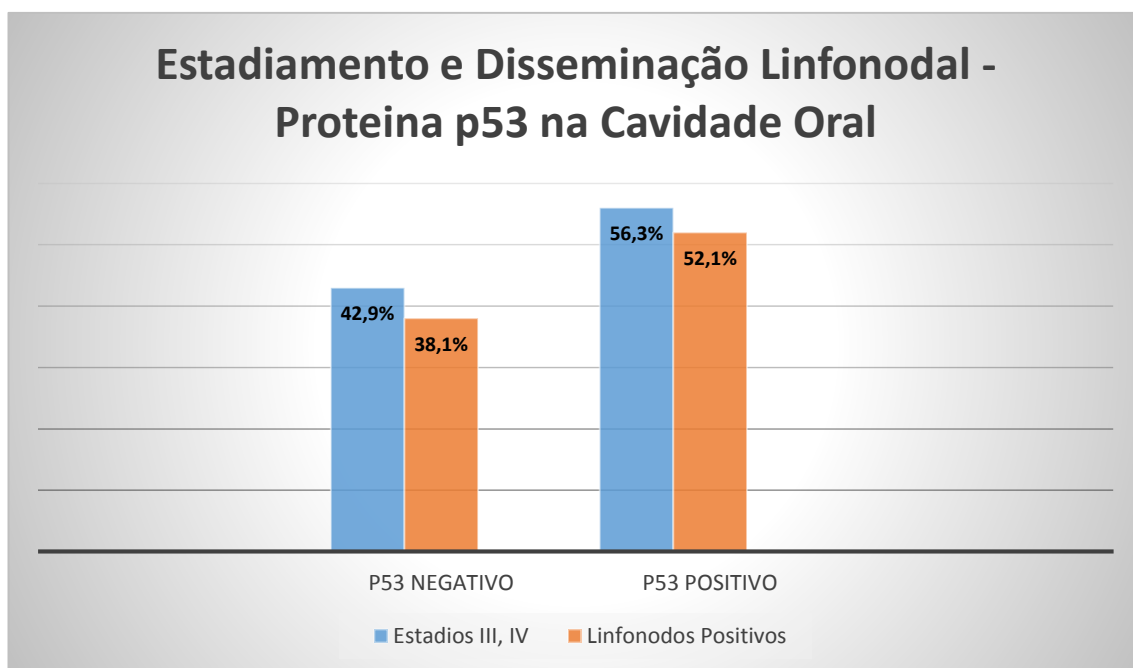
**Gráficos 19 e 20. Sobrevida dos pacientes com as proteínas p53 e/ou p16 – óbito pela doença**

Temos que o valor de p para o teste de Log-rank = 0,2119. Desse modo, temos que não há diferença entre as curvas de sobrevida.

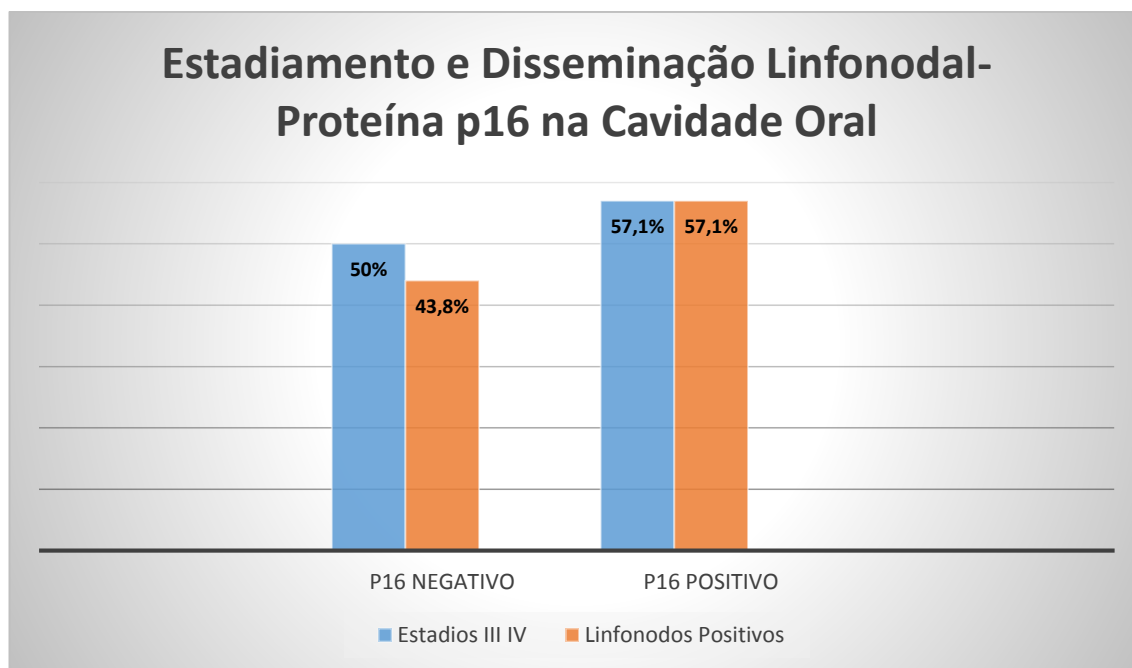




**Gráfico 21. Estadiamento e disseminação linfonodal da situação das proteínas p53 e p16 – cavidade oral**



**Gráfico 22. Estadiamento e disseminação linfonodal da situação da proteína p53 – cavidade oral**



**Gráfico 23. Estadiamento e disseminação linfonodal da situação da proteína p16 – cavidade oral**

## 4.2 Laringe

Na casuística de 79 pacientes com carcinoma de células escamosas na laringe, 72 (91,1%) eram do gênero masculino e 7 (8,9%) do feminino, com a idade média de 63,6 anos e a mediana de 63 anos. 44 (55,7%) pacientes eram tabagistas ativos, 31 (39,2%) eram ex-tabagistas e 4 (5,1%) nunca fumaram. 33 (41,8%) pacientes eram etilistas, 28 (35,4%) eram ex- etilistas e 18 (22,8%) não eram etilistas. O consumo de chimarrão foi relatado em 71 (89,8%) pacientes.

No grau de diferenciação do carcinoma de células escamosas, 39 (49,4%) eram carcinomas de células escamosas moderadamente diferenciados, 29 (36,7%) eram carcinomas de células escamosas bem diferenciados e 11 (13,9%) eram carcinomas pouco diferenciados. Assim, temos:

**Tabela 54. Localização na laringe: subsítios**

Localização	N	%	% dos válidos
<b>Glote</b>	<b>44</b>	<b>55,7</b>	<b>55,7</b>
Supra glote	20	25,3	25,3
Transglótico	15	19,0	19,0
Total	79	100,0	100,0

Observamos que em 44 (55,7%) pacientes a localização foi na glote.

**Tabela 55. Relação da frequência da proteína p53 na laringe**

<b>Proteína p53</b>	N	%	% dos válidos
Negativa	34	43,0	43,0
<b>Positiva</b>	<b>45</b>	<b>57,0</b>	<b>57,0</b>
Total	79	100,0	100,0

Observamos que 45 (57,0%) pacientes têm a proteína p53 positiva.

**Tabela 56. Relação do nível de expressividade da proteína p53 na laringe**

<b>Proteína p53</b>	N	%	% dos válidos
Nível A	7	8,9	8,9
Nível B	8	10,1	10,1
<b>Nível C</b>	<b>30</b>	<b>38</b>	<b>38</b>
Nível Negativo	34	43	43
Total	79	100,0	100,0

Observamos que 30 (38,0%) pacientes têm a proteína p53 nível C.

**Tabela 57. Relação da frequência da proteína p16 na laringe**

<b>Proteína p16</b>	N	%	% dos válidos
Negativa	56	70,9	70,9
<b>Positiva</b>	<b>23</b>	<b>29,1</b>	<b>29,1</b>
Total	79	100,0	100,0

Observamos que 23 (29,1%) pacientes têm a proteína p16 positiva.

**Tabela 58. Relação do grau da expressividade da proteína p16 na laringe**

<b>Proteína p16</b>	<b>N</b>	<b>%</b>	<b>% dos válidos</b>
Grau 1	17	21,5	21,5
Grau 2	4	5,1	5,1
Grau 3	2	2,5	2,5
<b>Grau 0</b>	<b>56</b>	<b>70,9</b>	<b>70,9</b>
Total	79	100,0	100,0

Observamos que 56 (70,9%) pacientes têm a proteína p16 grau 0.

**Tabela 59. Relação cruzada dos níveis e graus entre as proteínas p53 e p16**

Proteína p16		Proteína p53				Total
		Nível A	Nível B	Nível C	Nível Negativo	
Grau 1	N	1	0	9	7	17
	% por linha	5,9%	0,0%	52,9%	41,2%	100,0%
	% por coluna	14,3%	0,0%	30,0%	20,6%	21,5%
Grau 2	N	1	1	1	1	4
	% por linha	25,0%	25,0%	25,0%	25,0%	100,0%
	% por coluna	14,3%	12,5%	3,3%	2,9%	5,1%
Grau 3	N	0	1	0	1	2
	% por linha	0,0%	50,0%	0,0%	50,0%	100,0%
	% por coluna	0,0%	12,5%	0,0%	2,9%	2,5%
Grau 0	N	5	6	20	25	56
	% por linha	8,9%	10,7%	35,7%	44,6%	100,0%
	% por coluna	71,4%	75,0%	66,7%	73,5%	70,9%
Total	N	7	8	30	34	79
	% por linha	8,9%	10,1%	38,0%	43,0%	100,0%
	% por coluna	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

**Tabela 60. Situação das proteínas p53 e/ou p16 e a frequência**

<b>Grupo</b>	<b>N</b>	<b>%</b>	<b>% dos válidos</b>
p53 (-) e p16 (-)	25	31,6	31,6
<b>p53 (+) e p16 (-)</b>	<b>31</b>	<b>39,2</b>	<b>39,2</b>
p53 (-) e p16 (+)	9	11,4	11,4
p53 (+) e p16 (+)	14	17,7	17,7
Total	79	100,0	100,0

Observamos que 31 (39,2%) pacientes têm proteína p16 negativa e p53 positiva.

A seguir temos a tabela com alguns descritivos das variáveis, separados pelo grupo (Proteína p53 positiva ou negativa), com o nível descritivo da comparação deles.

**Tabela 61. Relação da proteína p53 com a idade**

Variável	Proteína p53	Média	Mediana	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	1º Quartil	3º Quartil	P-valor
Idade	Negativa	63,26	62,50	9,58	41,00	83,00	58,00	69,00	0,7549
	Positiva	64,00	63,00	10,86	48,00	89,00	55,00	72,00	

**Tabela 62. Relação da proteína p16 com a idade**

Variável	Proteína p16	Média	Mediana	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	1º Quartil	3º Quartil	P-valor
Idade	Negativa	63,82	63,00	9,45	41,00	87,00	58,00	70,50	0,8537
	Positiva	63,35	63,00	12,26	48,00	89,00	52,00	72,00	

Observamos que não houve diferença significativa entre as proteínas p53 e p16 em relação à idade.

**Tabela 63. Relação da proteína p53 com o gênero**

Gênero	Proteína p53				Total	
	Negativa		Positiva			
	N	%	N	%	N	%
Masculino	29	85,3%	43	95,6%	72	91,1%
Feminino	5	14,7%	2	4,4%	7	8,9%
Total	34	100,0%	45	100,0%	79	100,0%

**p-valor = 0,1334**

Observamos que no grupo da proteína p53 positiva 43 (95,6%) dos pacientes são do gênero masculino, enquanto que no grupo com a proteína p53 negativa temos 29 (85,3%). O valor de  $p = 0,1334$ . Assim, não temos associação estatisticamente significativa entre as variáveis.

**Tabela 64. Relação da proteína p53 com a localização na laringe**

Localização	Proteína p53				Total	
	Negativo		Positivo			
	N	%	N	%	N	%
Glote	18	52,9%	26	57,8%	44	55,7%
Supra glote	10	29,4%	10	22,2%	20	25,3%
Transglótico	6	17,6%	9	20,0%	15	19,0%
Total	34	100,0%	45	100,0%	79	100,0%

p-valor = 0,8205

Observamos que no grupo da proteína p53 positiva 9 (20,0%) dos pacientes têm a localização transglótica, enquanto que no grupo com a proteína p53 negativa temos 6 (17,6%). O valor de  $p = 0,8205$ . Assim, não temos associação estatisticamente significativa entre as variáveis.

**Tabela 65. Relação da proteína p53 com o tratamento**

Tratamento	Proteína p53				Total	
	Negativa		Positiva			
	N	%	N	%	N	%
Cirurgia	8	23,5%	9	20,0%	17	21,5%
Cirurgia + RT+ QT	10	29,4%	16	35,6%	26	32,9%
Cirurgia + RT	7	20,6%	7	15,6%	14	17,7%
Radioterapia exclusiva: Curativa	2	5,9%	8	17,8%	10	12,7%
QT + RT	6	17,6%	3	6,7%	9	11,4%
Tratamento paliativo: RT	1	2,9%	2	4,4%	3	3,8%
Total	34	100,0%	45	100,0%	79	100,0%

p-valor = 0,4314

Observamos que no grupo da proteína p53 positiva 9 (20,0%) dos pacientes têm tratamento somente pela cirurgia, enquanto que no grupo com a proteína p53 negativa temos 8 (23,5%). O valor de  $p = 0,4314$ . Desse modo, não temos associação estatisticamente significativa.

**Tabela 66. Relação da proteína p53 com a cirurgia no tratamento**

Cirurgia	Proteína p53				Total	
	Negativa		Positiva			
	N	%	N	%	N	%
Não	9	26,5%	13	28,9%	22	27,8%
<b>Sim</b>	<b>25</b>	<b>73,5%</b>	<b>32</b>	<b>71,1%</b>	<b>57</b>	<b>72,2%</b>
Total	34	100,0%	45	100,0%	79	100,0%

p-valor = 1,0000

Observamos que no grupo da proteína p53 positiva 32 (71,1%) dos pacientes tiveram tratamento por cirurgia, enquanto que no grupo com a proteína p53 negativa temos 25 (73,5%). O valor de  $p = 1,0000$ . Assim, não temos associação estatisticamente significativa entre as variáveis.

**Tabela 67. Relação da proteína p53 com o estadiamento**

Estádio	Proteína p53				Total	
	Negativa		Positiva			
	N	%	N	%	N	%
I II	15	44,1%	20	44,4%	35	44,3%
III IV	<b>19</b>	<b>55,9%</b>	<b>25</b>	<b>55,6%</b>	<b>44</b>	<b>55,7%</b>
Total	34	100,0%	45	100,0%	79	100,0%

p-valor = 1,0000

Observamos que no grupo da proteína p53 positiva 25 (55,6%) dos pacientes têm estadiamento III, IV, enquanto que no grupo com a proteína p53 negativa temos 19 (55,9%). O valor de  $p = 1,0000$ . Assim, não temos associação estatisticamente significativa entre as variáveis.

**Tabela 68. Relação da proteína p53 com o tumor (T)**

Tumor	Proteína p53				Total	
	Negativa		Positiva			
	N	%	N	%	N	%
<b>T1</b>	9	26,5%	10	22,2%	19	24,1%
<b>T2</b>	11	32,4%	12	26,7%	23	29,1%
<b>T3</b>	9	26,5%	8	17,8%	17	21,5%
<b>T4</b>	<b>5</b>	<b>14,7%</b>	<b>15</b>	<b>33,3%</b>	<b>20</b>	<b>25,3%</b>
Total	34	100,0%	45	100,0%	79	100,0%

p-valor = 0,2949

Observamos que no grupo da proteína p53 positiva 15 (33,3%) dos pacientes têm tumor T4, enquanto que no grupo com a proteína p53 negativa temos 5 (14,7%). O valor de  $p = 0,2949$ . Assim, não temos associação estatisticamente significativa entre as variáveis.

**Tabela 69. Relação da proteína p53 com a disseminação linfonodal**

Linfonodos	Proteína p53				Total	
	Negativa		Positiva			
	N	%	N	%	N	%
<b>Positivo</b>	<b>13</b>	<b>38,2%</b>	<b>10</b>	<b>22,2%</b>	<b>23</b>	<b>29,1%</b>
<b>Negativo</b>	21	61,8%	35	77,8%	56	70,9%
<b>Total</b>	34	100,0%	45	100,0%	79	100,0%

**p-valor = 0,1399**

Observamos que no grupo da proteína p53 positiva 10 (22,2%) dos pacientes têm linfonodos positivos, enquanto que no grupo com a proteína p53 negativa temos 13 (38,2%). O valor de  $p = 0,1399$ . Assim, não temos associação estatisticamente significativa entre as variáveis.

**Tabela 70. Relação da proteína p53 com o linfonodo (N)**

Linfonodos	Proteína p53				Total	
	Negativa		Positiva			
	N	%	N	%	N	%
<b>N0</b>	21	61,8%	35	77,8%	56	70,9%
<b>N1</b>	5	14,7%	3	6,7%	8	10,1%
<b>N2a</b>	4	11,8%	1	2,2%	5	6,3%
<b>N2b</b>	2	5,9%	5	11,1%	7	8,9%
<b>N2c</b>	<b>2</b>	<b>5,9%</b>	<b>1</b>	<b>2,2%</b>	<b>3</b>	<b>3,8%</b>
<b>Total</b>	34	100,0%	45	100,0%	79	100,0%

**p-valor = 0,1936**

Observamos que no grupo da proteína p53 positiva 1 (2,2%) dos pacientes tem linfonodos N2c, enquanto que no grupo com a proteína p53 negativa temos 2 (5,9%). O valor de  $p$  foi de 0,1936. Assim, não temos associação estatisticamente significativa entre as variáveis.



**Tabela 71. Relação da proteína p53 com a recidiva**

Recidiva	Proteína p53				Total	
	Negativa		Positiva			
	N	%	N	%	N	%
Não	25	73,5%	27	60,0%	52	65,8%
Sim	9	26,5%	18	40,0%	27	34,2%
Total	34	100,0%	45	100,0%	79	100,0%
p-valor = 0,2389						

Observamos que no grupo da proteína p53 positiva 18 (40,0%) dos pacientes tiveram recidivas, enquanto que no grupo com a proteína p53 negativa temos 9 (26,5%). O valor de  $p = 0,2389$ . Assim, não temos associação estatisticamente significativa entre as variáveis.

**Tabela 72. Relação da proteína p53 com óbito geral**

Obito3a	Proteína p53				Total	
	Negativa		Positiva			
	N	%	N	%	N	%
Não	28	82,4%	30	66,7%	58	73,4%
<b>Sim</b>	<b>6</b>	<b>17,6%</b>	<b>15</b>	<b>33,3%</b>	<b>21</b>	<b>26,6%</b>
Total	34	100,0%	45	100,0%	79	100,0%

Observamos que 15 (33,3%) dos pacientes com a proteína p53 positiva evoluíram para óbito geral *versus* 6 (17,6%) pacientes com a proteína p53 negativa evoluíram para óbito geral.

**Tabela 73. Relação da proteína p53 com óbito pela doença**

Óbito pela doença 3ª	Proteína p53				Total	
	Negativa		Positiva			
	N	%	N	%	N	%
Não	28	82,4%	33	73,3%	61	77,2%
Sim	6	17,6%	12	26,7%	18	22,8%
Total	34	100.0%	45	100.0%	79	100.0%

Observamos que 12 (26,7%) dos pacientes com a proteína p53 positiva evoluíram para óbito pela doença *versus* 6 (17,6%) pacientes com a proteína p53 negativa evoluíram para óbito pela doença.

**Tabela 74. Relação do nível da proteína p53 com óbito geral**

Óbito 3a	Proteína p53								Total	
	Nível A		Nível B		Nível C		Nível Negativo			
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Não	5	71,4%	7	87,5%	18	60,0%	28	82,4%	58	73,4%
Sim	2	28,6%	1	12,5%	12	40,0%	6	17,6%	21	26,6%
Total	7	100,0%	8	100,0%	30	100,0%	34	100,0%	79	100,0%

Observamos que 6 (17,6%) dos pacientes com a proteína p53 negativa tiveram evolução para óbito geral *versus* 12 (40%) dos pacientes com a proteína p53 positiva nível C evoluíram para óbito geral.

**Tabela 75. Relação do nível da proteína p53 com óbito pela doença**

Óbito pela doença 3ª	Proteína p53								Total	
	Nível A		Nível B		Nível C		Nível Negativo			
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Não	5	71,4%	8	100,0%	20	66,7%	28	82,4%	61	77,2%
Sim	<b>2</b>	<b>28,6%</b>	<b>0</b>	<b>0,0%</b>	<b>10</b>	<b>33,3%</b>	<b>6</b>	<b>17,6%</b>	18	22,8%
Total	7	100,0%	8	100,0%	30	100,0%	34	100,0%	79	100,0%

Observamos 6 (17,6%) de pacientes com a proteína p53 negativa evoluíram para óbito pela doença *versus* 10 (33,3%) pacientes com a proteína p53 positiva nível C evoluíram para óbito pela doença.

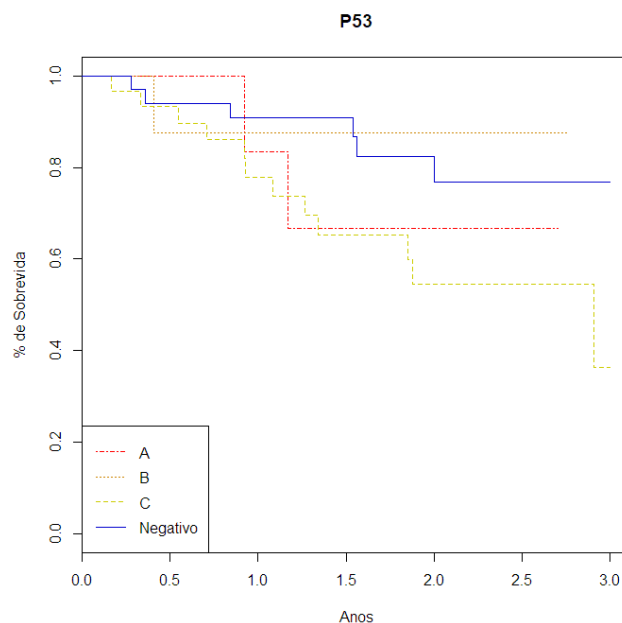
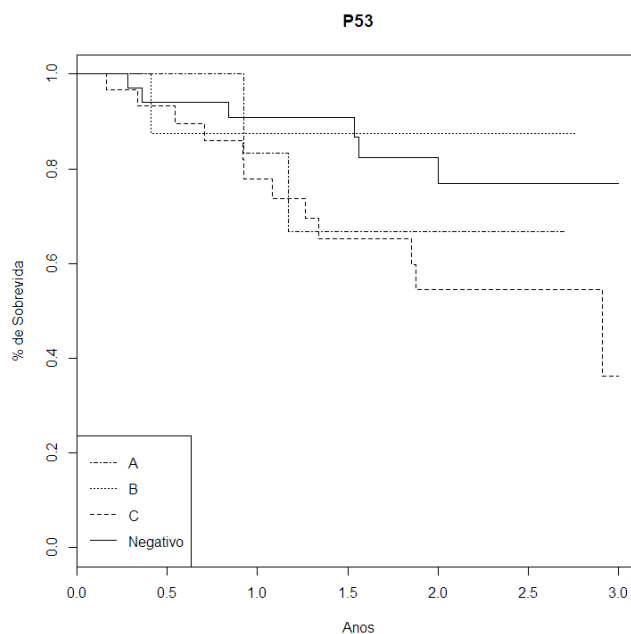
Observação: Nos pacientes com proteína p53 positiva nível A havia 1 (14,3%) paciente com p16 positiva grau 1, 1 (14,3%) paciente com p16 positiva grau 2, 0 (0%) pacientes com proteína p16 grau 3 e 5 (71,4%) pacientes com p16 grau 0.

Nos pacientes com proteína p53 positiva nível B, havia 0 (0%) pacientes grau 1, 1 (12,5%) paciente proteína p16 grau 2, 1 (12,5%) paciente p16 grau 3 e 6 (75%) pacientes com proteína p16 grau 0.

Nos pacientes com proteína p 53 nível C havia 9 (30%) pacientes p16 grau 1, 1 (3,3%) paciente com p16 grau 2, 0 (0%) pacientes com proteína p16 grau 3 e 20 (66,7%) pacientes com proteína p16 grau 0.

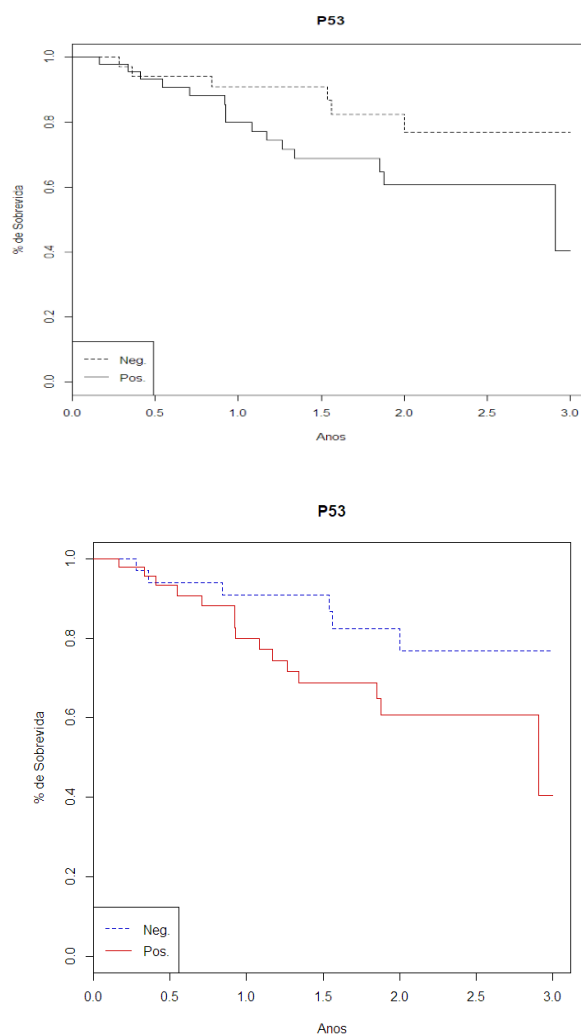
Nos pacientes p53 negativo havia 7 (20,6%) pacientes p16 positiva grau 1, 1 (2,9%) paciente p16 positiva grau 2, 1 (2,9%) paciente p16 positiva grau 3 e 25 (73,5%) pacientes p16 grau 0.

A seguir temos os gráficos com as curvas de sobrevivência para óbito geral, calculadas pelo estimador de Kaplan-Meier para cada nível da proteína p53 (Gráficos 25 e 26).



**Gráficos 24 e 25. Relação do nível da proteína p53 com a sobrevida dos pacientes – óbito geral**

Temos que o valor de p para o teste de Log-rank = 0,1681. Temos que quando maior o grau do p53 menor a sobrevida. Porém, não temos diferença significativa entre as curvas de sobrevida.



**Gráfico 26 e 27. Relação da sobrevida de pacientes com proteína p53 – óbito geral**

Temos que o valor de p para o teste de Log-rank = 0,0753. Assim, temos que não há diferença entre as curvas de sobrevida.

**Tabela 76. Modelo de Cox univariado da proteína p53: óbito geral**

Variável	H.R.	IC (95%)		P-valor
		Lim. Inf	Lim. Sup.	
<b>p53 (+)</b>	<b>2,327</b>	<b>0,894</b>	<b>6,062</b>	<b>0,0837</b>

Observamos que o H.R. foi de aproximadamente 2,3. Assim, temos que quem tem a proteína p53 positiva tem 2,3 vezes mais chances de evoluir para óbito geral do que os pacientes com a proteína p53 negativa. O valor de p = 0,0837 sendo não significativo.

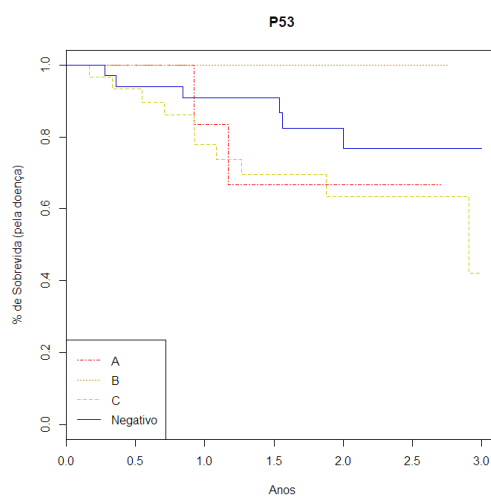
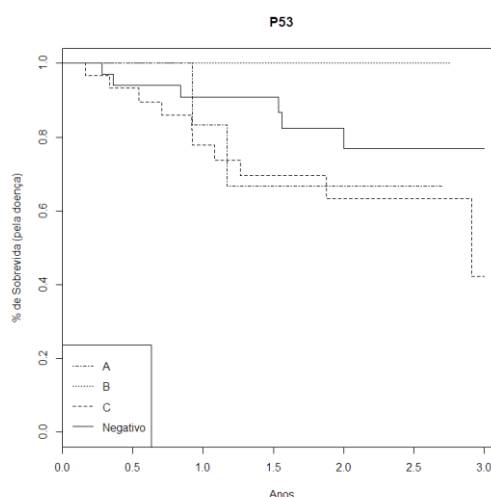
A seguir temos o modelo de Cox ajustado pelo sexo e idade.

**Tabela 77. Modelo de Cox da proteína p53 ajustada pelo sexo e idade**

Variável	H.R.	IC (95%)		P-valor
		Lim. Inf	Lim. Sup.	
<b>p53 (+)</b>	<b>2,936</b>	<b>1,013</b>	<b>8,515</b>	<b>0,0474</b>

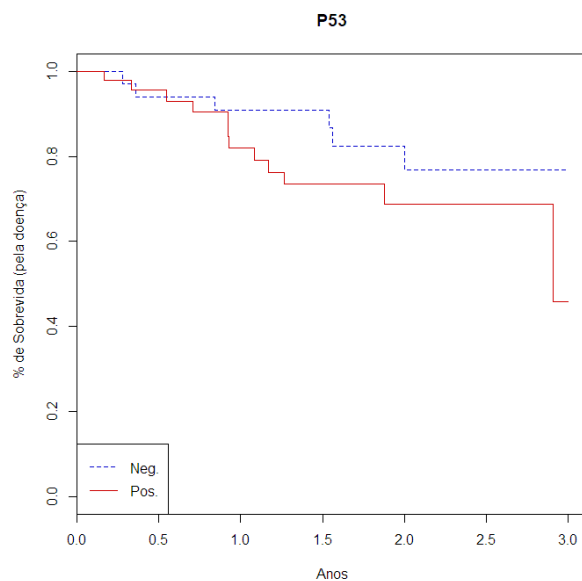
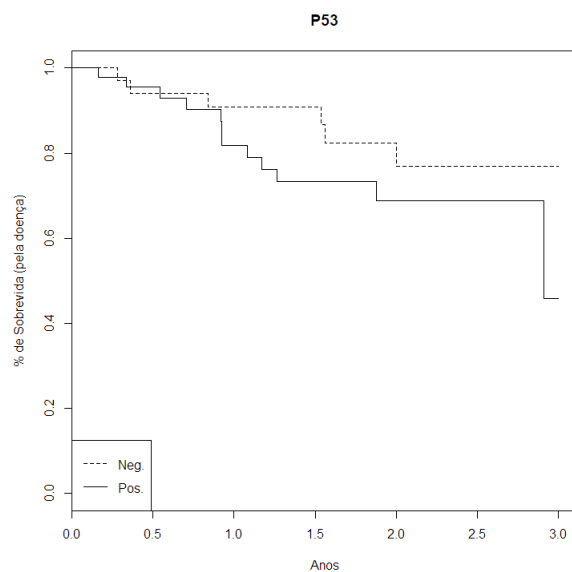
Observamos que o H.R. foi de aproximadamente 2,9. Assim, temos que quem tem a proteína p53 positiva tem 2,9 vezes mais chances de evoluir para óbito geral do que os pacientes com a proteína p53 negativa. O valor de  $p = 0,0474$  sendo estatisticamente significativo.

A seguir temos os gráficos com as curvas de sobrevivência para óbito pela doença, calculadas pelo estimador de Kaplan-Meier para cada categoria do p53.



**Gráfico 28 e 29. Relação do nível da proteína p53 com a sobrevivência dos pacientes – óbito pela doença**

Temos que o valor de p para o teste de Log-rank = 0,1887. Assim, temos que não há diferença entre as curvas de sobrevivência.



**Gráficos 30 e 31. Relação da sobrevivência entre pacientes com a proteína p53 – óbito pela doença**

Temos que o valor de p para o teste de Log-rank = 0,2100. Assim, temos que não há diferença entre as curvas de sobrevivência.

A seguir, temos:

**Tabela 78. Modelo de Cox univariado da proteína p53: óbito pela doença**

Variável	H.R.	IC (95%)		P-valor
		Lim. Inf	Lim. Sup.	
<b>p53 (+)</b>	<b>1,868</b>	<b>0,693</b>	<b>5,039</b>	<b>0,2169</b>

Observamos que o H.R. foi de aproximadamente 1,9. Assim temos que quem tem a proteína p53 positiva tem 1,9 vezes mais chances de evoluir para óbito pela doença do que os pacientes com a proteína p53 negativa. O valor de  $p = 0,2169$  sendo não significativo.

**Tabela 79. Modelo de Cox da proteína p53 ajustado pelo sexo e idade**

Variável	H.R.	IC (95%)		P-valor
		Lim. Inf	Lim. Sup.	
<b>p53 (+)</b>	<b>2,516</b>	<b>0,822</b>	<b>7,701</b>	<b>0,1061</b>

Observamos que o H.R. foi de aproximadamente 2,5. Assim temos que quem tem a proteína p53 positiva tem 2,5 vezes mais chances de evoluir para óbito pela doença do que os pacientes com p53 negativa. O valor de  $p = 0,1061$  sendo não significativo.

#### 4.2.1 Em relação à proteína p16

**Tabela 80. Relação da proteína 16 com o gênero**

Gênero	Proteína p16				Total	
	Negativa		Positiva		N	%
	N	%	N	%		
<b>Masculino</b>	<b>51</b>	<b>91,1%</b>	<b>21</b>	<b>91,3%</b>	<b>72</b>	91,1%
<b>Feminino</b>	<b>5</b>	<b>8,9%</b>	<b>2</b>	<b>8,7%</b>	<b>7</b>	8,9%
<b>Total</b>	<b>56</b>	<b>100,0%</b>	<b>23</b>	<b>100,0%</b>	<b>79</b>	100,0%

**p-valor = 1,0000**

Observamos que no grupo da proteína p16 positiva 21 (91,3%) dos pacientes são do gênero masculino enquanto que no grupo de pacientes com a proteína p16 negativa temos 51 (91,1%). O valor de  $p = 1,0000$ . Assim, não temos associação estatisticamente significativa entre as variáveis.

**Tabela 81. Relação da proteína p16 com a localização na laringe**

Localização	Proteína p16				Total	
	Negativa		Positiva			
	N	%	N	%	N	%
<b>Glote</b>	<b>33</b>	<b>58,9%</b>	<b>11</b>	<b>47,8%</b>	<b>44</b>	<b>55,7%</b>
<b>Supra glote</b>	13	23,2%	7	30,4%	20	25,3%
<b>Transglótico</b>	10	17,9%	5	21,7%	15	19,0%
<b>Total</b>	56	100,0%	23	100,0%	79	100,0%

p-valor = 0,6690

Observamos que no grupo da proteína p16 positiva 11 (47,8%) dos pacientes têm localização na glote enquanto que no grupo com a proteína p16 negativa temos 33 (58,9%). O valor de  $p = 0,6690$ . Assim, não temos associação estatisticamente significativa entre as variáveis.

**Tabela 82. Relação da proteína p16 com o tratamento**

Tratamento	Proteína p16				Total	
	Negativa		Positiva			
	N	%	N	%	N	%
<b>Cirurgia</b>	<b>13</b>	<b>23,2%</b>	<b>4</b>	<b>17,4%</b>	<b>17</b>	<b>21,5%</b>
<b>Cirurgia + RT + QT</b>	20	35,7%	6	26,1%	26	32,9%
<b>Cirurgia + RT</b>	10	17,9%	4	17,4%	14	17,7%
<b>Radioterapia exclusiva curativa</b>	7	12,5%	3	13,0%	10	12,7%
<b>QT + RT</b>	3	5,4%	6	26,1%	9	11,4%
<b>Tratamento paliativo- RT</b>	3	5,4%	0	0,0%	3	3,8%
<b>Total</b>	56	100,0%	23	100,0%	79	100,0%

p-valor = 0,2108

Observamos que no grupo da proteína p16 positiva 4 (17,4%) dos pacientes têm tratamento por cirurgia exclusivamente enquanto que no grupo com a proteína p16 negativa temos 13 (23,2%). O valor de  $p = 0,2108$ . Assim, não temos associação estatisticamente significativa entre as variáveis.



**Tabela 83. Relação da proteína p16 com a cirurgia no tratamento**

Cirurgia	Proteína p16				Total	
	Negativa		Positiva			
	N	%	N	%	N	%
Não	13	23,2%	9	39,1%	22	27,8%
<b>Sim</b>	<b>43</b>	<b>76,8%</b>	<b>14</b>	<b>60,9%</b>	<b>57</b>	<b>72,2%</b>
Total	56	100,0%	23	100,0%	79	100,0%

p-valor = 0,1745

Observamos que no grupo da proteína p16 positiva 14 (60,9%) dos pacientes têm tratamento pela cirurgia enquanto que no grupo com a proteína p16 negativa temos 43 (76,8%). O valor de  $p = 0,1745$ . Assim, não temos associação estatisticamente significativa entre as variáveis.

**Tabela 84. Relação da proteína p16 com o estadiamento**

Estádio	Proteína p16				Total	
	Negativa		Positiva			
	N	%	N	%	N	%
I II	27	48,2%	8	34,8%	35	44,3%
<b>III IV</b>	<b>29</b>	<b>51,8%</b>	<b>15</b>	<b>65,2%</b>	<b>44</b>	<b>55,7%</b>
Total	56	100,0%	23	100,0%	79	100,0%

p-valor = 0,3251

Observamos que no grupo com a proteína p16 positiva 15 (65,2%) dos pacientes têm estadiamento III, IV, enquanto que no grupo com a proteína p16 negativa temos 29 (51,8%). O valor de  $p = 0,3251$ . Desse modo, não temos associação estatisticamente significativa entre as variáveis.

**Tabela 85. Relação da proteína p16 com o tumor (T)**

Tumor	Proteína p16				Total	
	Negativa		Positiva			
	N	%	N	%	N	%
<b>T1</b>	15	26,8%	4	17,4%	19	24,1%
<b>T2</b>	19	33,9%	4	17,4%	23	29,1%
<b>T3</b>	8	14,3%	9	39,1%	17	21,5%
<b>T4</b>	<b>14</b>	<b>25,0%</b>	<b>6</b>	<b>26,1%</b>	<b>20</b>	<b>25,3%</b>
Total	56	100,0%	23	100,0%	79	100,0%

p-valor = 0,0865

Observamos que no grupo com a proteína p16 positiva 6 (26,1%) dos pacientes têm tumor T4, enquanto que no grupo com a proteína p16 negativa temos 14 (25%). O valor de  $p = 0,0865$ . Assim, não temos associação estatisticamente significativa entre as variáveis.

**Tabela 86. Relação da proteína p16 com a disseminação linfonodal**

Linfonodos	Proteína p16				Total	
	Negativa		Positiva			
	N	%	N	%	N	%
Positivos	14	25,0%	9	39,1%	23	29,1%
Negativos	42	75,0%	14	60,9%	56	70,9%
Total	56	100,0%	23	100,0%	79	100,0%
p-valor = 0,2764						

Observamos que no grupo com a proteína p16 positiva 9 (39,1%) dos pacientes têm linfonodos positivos, enquanto que no grupo com proteína p16 negativa temos 14 (25%). O valor de  $p = 0,2764$ . Assim, não temos associação estatisticamente significativa entre as variáveis.

**Tabela 87. Relação da proteína p16 com linfonodo (N)**

Linfonodos	Proteína p16				Total	
	Negativa		Positiva			
	N	%	N	%	N	%
N0	42	75,0%	14	60,9%	56	70,9%
N1	6	10,7%	2	8,7%	8	10,1%
N2a	2	3,6%	3	13,0%	5	6,3%
N2b	4	7,1%	3	13,0%	7	8,9%
<b>N2c</b>	<b>2</b>	<b>3,6%</b>	<b>1</b>	<b>4,3%</b>	<b>3</b>	<b>3,8%</b>
Total	56	100,0%	23	100,0%	79	100,0%

**p-valor = 0.4034**

Observamos que no grupo com a proteína p16 positiva 1 (4,3%) dos pacientes tem linfonodos N2c, enquanto que no grupo com proteína p16 negativa temos 2 (3,6%). O valor de  $p = 0,4034$ . Assim, não temos associação estatisticamente significativa entre as variáveis.

Tabela 88. Relação da proteína p16 com a recidiva

Recidiva	Proteína p16				Total	
	Negativa		Positiva			
	N	%	N	%	N	%
Não	39	69,6%	13	56,5%	52	65,8%
Sim	17	30,4%	10	43,5%	27	34,2%
Total	56	100,0%	23	100,0%	79	100,0%

p-valor = 0,3027

Observamos que no grupo com a proteína p16 positiva 10 (43,5%) dos pacientes tiveram recidiva, enquanto que no grupo com a proteína p16 negativa temos 17 (30,4%). O valor de  $p = 0,3027$ . Assim, não temos associação estatisticamente significativa entre as variáveis.

Tabela 89. Relação da proteína p16 com óbito geral

Óbito3a	Proteína p16				Total	
	Negativa		Positiva			
	N	%	N	%	N	%
Não	42	75,0%	16	69,6%	58	73,4%
Sim	14	25,0%	7	30,4%	21	26,6%
Total	56	100,0%	23	100,0%	79	100,0%

Observamos que 7 (30,4%) dos pacientes com proteína p16 positiva evoluíram para óbito geral *versus* 14 (25%) dos pacientes com a proteína p16 negativa evoluíram para óbito geral.

Tabela 90. Relação da proteína p16 com óbito pela doença

Óbito pela doença 3ª	Proteína p16				Total	
	Negativa		Positiva			
	N	%	N	%	N	%
Não	44	78,6%	17	73,9%	61	77,2%
Sim	12	21,4%	6	26,1%	18	22,8%
Total	56	100,0%	23	100,0%	79	100,0%

Observamos que 6 (26,1%) dos pacientes com a proteína p16 positiva evoluíram para óbito pela doença *versus* 12 (21,4%) dos pacientes com a proteína p16 negativa evoluíram para óbito pela doença.

Tabela 91. Relação do grau da proteína p16 com o óbito geral

Óbito 3a	Proteína p16								Total	
	Grau 1		Grau 2		Grau 3		Grau 0			
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Não	11	64,7%	4	100,0%	1	50,0%	42	75,0%	58	73,4%
Sim	6	35,3%	0	0,0%	1	50,0%	14	25,0%	21	26,6%
Total	17	100,0%	4	100,0%	2	100,0%	56	100,0%	79	100,0%

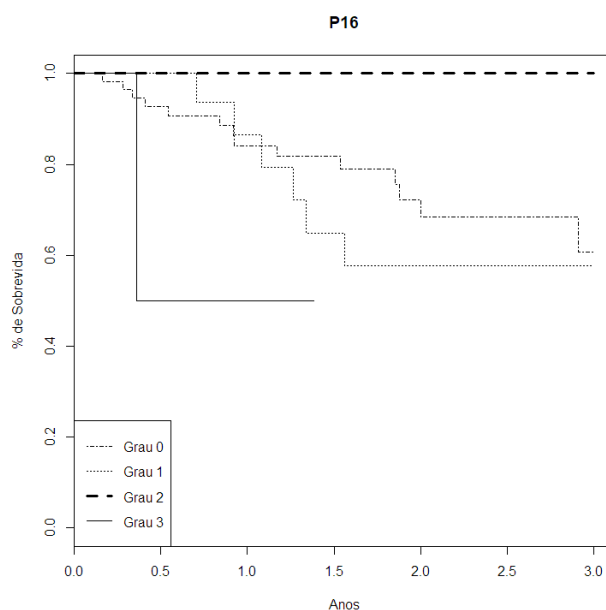
Observamos 6 (35,3%) pacientes com proteína p16 positiva grau 1 evoluíram para óbito geral *versus* 14 (25%) pacientes com proteína p16 grau 0 que evoluíram para óbito geral.

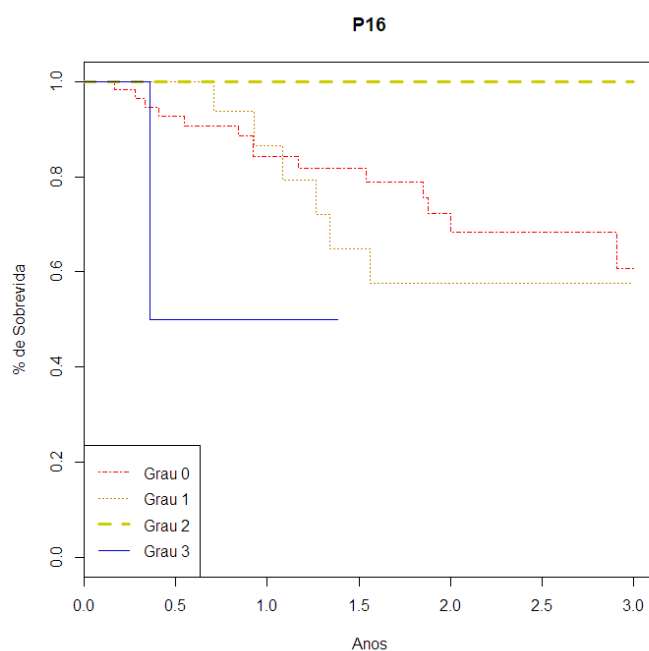
Tabela 92. Relação do grau da proteína p16 com o óbito pela doença

Óbito pela doença 3ª	Proteína p16									Total	
	Grau 1		Grau 2		Grau 3		Grau 0				
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%	
Não	12	70,6%	4	100,0%	1	50,0%	44	78,6%	61	77,2%	
Sim	5	29,4%	0	0,0%	1	50,0%	12	21,4%	18	22,8%	
Total	17	100,0%	4	100,0%	2	100,0%	56	100,0%	79	100,0%	

Observamos 5 (29,4%) pacientes com proteína p16 positiva grau 1 que evoluíram para óbito pela doença *versus* 12 (21,4%) pacientes com proteína p16 grau 0 que evoluíram para óbito pela doença.

A seguir temos os Gráficos 32 e 33 com as curvas de sobrevivência para óbito geral, calculadas pelo estimador de Kaplan-Meier para cada categoria do p16.

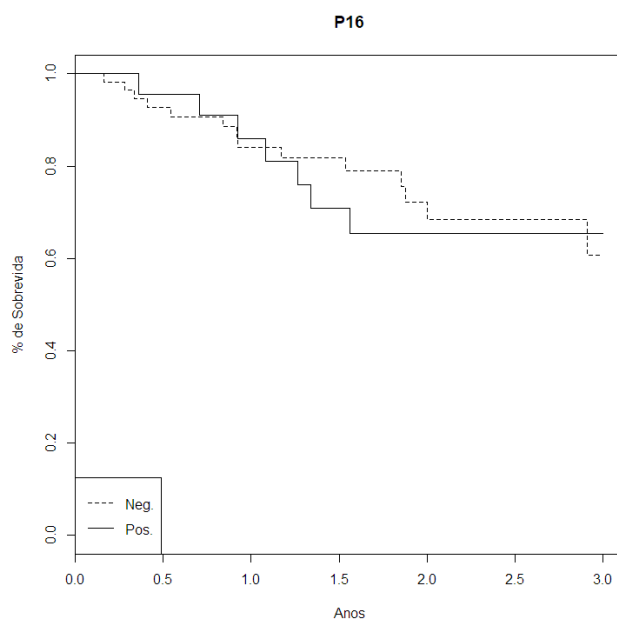


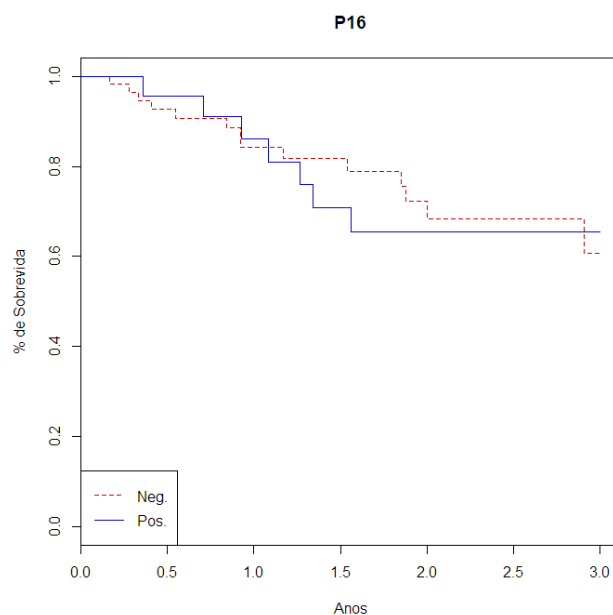


**Gráficos 32 e 33. Relação do grau da proteína p16 com a sobrevida dos pacientes – óbito geral**

Temos que o valor de p para o teste de Log-rank = 0,2794. Assim, temos que não há diferença entre as curvas de sobrevida.

Observando os gráficos de sobrevida para óbito geral (Gráficos 34 e 35), temos que o valor de p para o teste de Log-rank = 0,8121. Assim, temos que não há diferença entre as curvas de sobrevida.





**Gráficos 34 e 35. Relação da sobrevida dos pacientes com a proteína p16 com óbito geral**

A seguir temos o modelo de Cox univariado para o p16.

**Tabela 93. Modelo de Cox univariado da proteína p16: óbito geral**

Variável	H.R.	IC (95%)		P-valor
		Lim. Inf	Lim. Sup.	
p16 (+)	1,116	0,450	2,768	0,8122

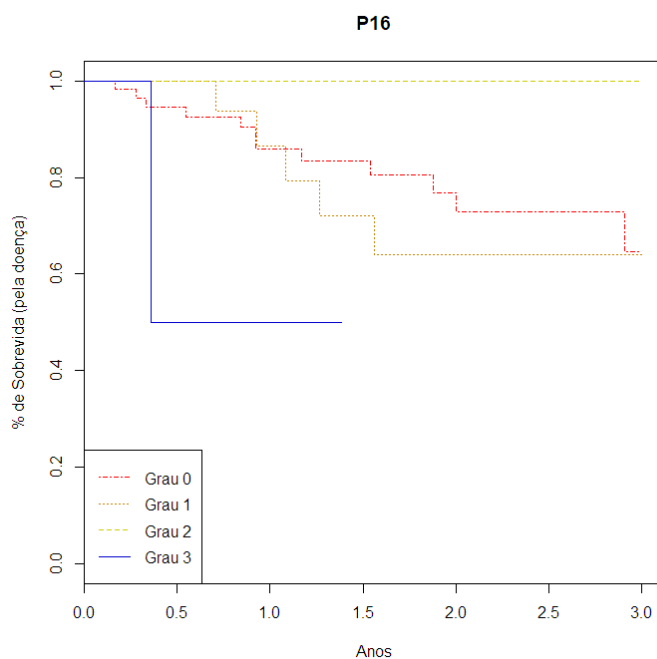
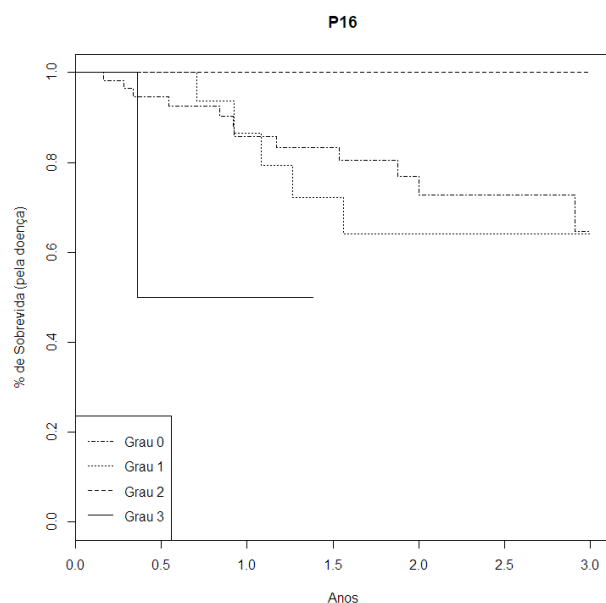
Observamos que o H.R. foi de aproximadamente 1,1. Assim temos que quem tem a proteína p16 positiva tem 1,1 vezes mais chances de evoluir para óbito geral do que os pacientes com a proteína p16 negativa. O valor de  $p = 0,8122$  sendo não significativo.

**Tabela 94. Modelo de Cox da proteína p16 ajustado pelo sexo e idade**

Variável	H.R.	IC (95%)		P-valor
		Lim. Inf	Lim. Sup.	
p16 (+)	1,197	0,479	2,989	0,7001

Observamos que o H.R. foi de aproximadamente 1,2. Assim temos que quem tem a proteína p16 positiva tem 1,2 vezes mais chances de evoluir para óbito geral do que os pacientes com a proteína p16 negativa. O valor de  $p = 0,7001$  sendo não significativo.

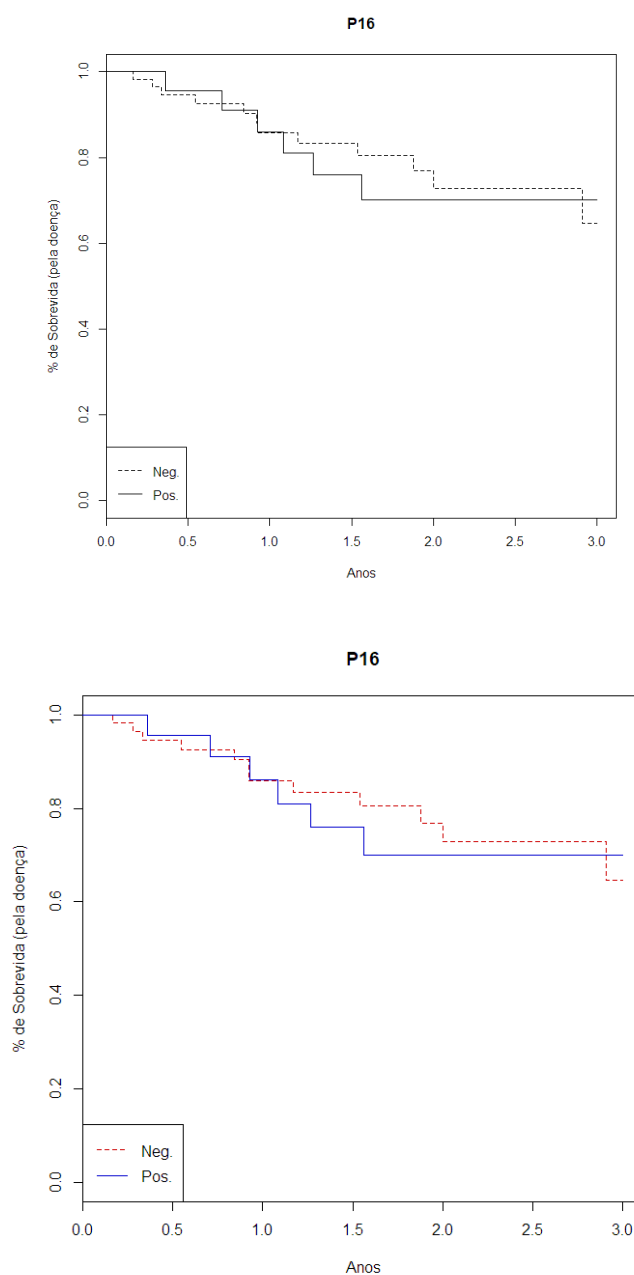
A seguir temos os Gráficos 36 e 37 com as curvas de sobrevivência para óbito pela doença, calculadas pelo estimador de Kaplan-Meier para cada categoria do p16.



**Gráficos 36 e 37. Relação do grau da proteína p16 com a sobrevida dos pacientes – óbito pela doença**

Temos que o valor de p para o teste de Log-rank = 0,2818. Assim, temos que não há diferença entre as curvas de sobrevida.

Neste momento, observemos os gráficos de sobrevida para óbito pela doença (Gráficos 38 e 39).



**Gráficos 38 e 39. Relação da sobrevida dos pacientes com proteína p16 com óbito pela doença**

Temos que o valor de p para o teste de Log-rank = 0,8340. Assim, temos que não há diferença entre as curvas de sobrevida.

A seguir temos o modelo de Cox univariado para o p16.



**Tabela 95. Modelo de Cox univariado da proteína p16: óbito pela doença**

Variável	H.R.	IC (95%)		P-valor
		Lim. Inf	Lim. Sup.	
<b>p16 (+)</b>	<b>1,111</b>	<b>0,416</b>	<b>2,961</b>	<b>0,8341</b>

Observamos que o H.R. foi de aproximadamente 1,1. Assim temos que quem tem a proteína p16 positiva tem 1,1 vezes mais chances de evoluir para óbito pela doença do que os pacientes com a proteína p16 negativa. O valor de  $p = 0,8341$  sendo não significativo.

**Tabela 96. Modelo de Cox da proteína p16 ajustado pelo sexo e idade**

Variável	H.R.	IC (95%)		P-valor
		Lim. Inf	Lim. Sup.	
<b>p16 (+)</b>	<b>1,175</b>	<b>0,436</b>	<b>3,170</b>	<b>0,7501</b>

Observamos que o H.R. foi de aproximadamente 1,17. Assim temos que quem tem a proteína p16 positiva tem 1,17 vezes mais chances de evoluir para óbito pela doença do que os pacientes com a proteína p16 negativa. O valor de  $p = 0,7501$  sendo não significativo.

#### 4.2.2 Aspectos das Proteínas p53 e p16 isoladas ou associadas

**Tabela 97. Relação das proteínas p53 e/ou p16 associadas com a localização**

Localização	Grupo								Total	
	p53 (-) e p16 (-)		p53 (+) e p16 (-)		p53 (-) e p16 (+)		p53 (+) e p16 (+)			
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Glote	14	56,0%	19	61,3%	4	44,4%	7	50,0%	44	55,7%
Supra glote	7	28,0%	6	19,4%	3	33,3%	4	28,6%	20	25,3%
Transglótica	4	16,0%	6	19,4%	2	22,2%	3	21,4%	15	19,0%
Total	25	100,0%	31	100,0%	9	100,0%	14	100,0%	79	100,0%

p-valor = 0,9434

O valor de  $p = 0,9434$ . Assim, não temos associação estatisticamente significativa entre as variáveis.

**Tabela 98. Relação das proteínas p53 e/ou p16 com o estadiamento**

Estadio	Grupo								Total	
	p53 (-) e p16 (-)		p53 (+) e p16 (-)		p53 (-) e p16 (+)		p53 (+) e p16 (+)		N	%
	N	%	N	%	N	%	N	%		
<b>I II</b>	12	48,0%	15	48,4%	3	33,3%	5	35,7%	35	44,3%
<b>III IV</b>	<b>13</b>	<b>52,0%</b>	<b>16</b>	<b>51,6%</b>	<b>6</b>	<b>66,7%</b>	<b>9</b>	<b>64,3%</b>	44	55,7%
<b>Total</b>	25	100,0%	31	100,0%	9	100,0%	14	100,0%	79	100,0%

p-valor = 0,7630

O valor de  $p = 0,7630$ . Assim, não temos associação estatisticamente significativa entre as variáveis.

**Tabela 99. Relação das proteínas p53 e/ou p16 com o tumor (T)**

Tumor	Grupo								Total	
	p53 (-) e p16 (-)		p53 (+) e p16 (-)		p53 (-) e p16 (+)		p53 (+) e p16 (+)		N	%
	N	%	N	%	N	%	N	%		
T1	8	32,0%	7	22,6%	1	11,1%	3	21,4%	19	24,1%
T2	9	36,0%	10	32,3%	2	22,2%	2	14,3%	23	29,1%
T3	4	16,0%	4	12,9%	5	55,6%	4	28,6%	17	21,5%
T4	<b>4</b>	<b>16,0%</b>	<b>10</b>	<b>32,3%</b>	<b>1</b>	<b>11,1%</b>	<b>5</b>	<b>35,7%</b>	20	25,3%
<b>Total</b>	25	100,0%	31	100,0%	9	100,0%	14	100,0%	79	100,0%

p-valor = 0,2673

O valor de  $p = 0,2673$ . Assim, não temos associação estatisticamente significativa entre as variáveis.

**Tabela 100. Relação das proteínas p53 e/ou p16 com a disseminação linfonodal**

Linfonodos	Grupo								Total	
	p53 (-) e p16(-)		p53 (+) e p16(-)		p53 (-) e p16(+)		p53 (+) e p16(+)		N	%
	N	%	N	%	N	%	N	%		
<b>Positivos</b>	<b>8</b>	<b>32,0%</b>	<b>6</b>	<b>19,4%</b>	<b>5</b>	<b>55,6%</b>	<b>4</b>	<b>28,6%</b>	23	29,1%
<b>Negativos</b>	17	68,0%	25	80,6%	4	44,4%	10	71,4%	56	70,9%
<b>Total</b>	25	100,0%	31	100,0%	9	100,0%	14	100,0%	79	100,0%

p-valor = 0,2203

O valor de  $p = 0,2203$ . Assim, não temos associação estatisticamente significativa entre as variáveis.

Tabela 101. Relação das proteínas p53 e/ou p16 com o linfonodo (N)

Linfonodos	Grupo								Total	
	p53 (-) e p16 (-)		p53 (+) e p16 (-)		p53 (-) e p16 (+)		p53 (+) e p16 (+)		N	%
	N	%	N	%	N	%	N	%		
<b>N0</b>	17	68,0%	25	80,6%	4	44,4%	10	71,4%	56	70,9%
<b>N1</b>	4	16,0%	2	6,5%	1	11,1%	1	7,1%	8	10,1%
<b>N2a</b>	2	8,0%	0	0,0%	2	22,2%	1	7,1%	5	6,3%
<b>N2b</b>	<b>1</b>	<b>4,0%</b>	<b>3</b>	<b>9,7%</b>	<b>1</b>	<b>11,1%</b>	<b>2</b>	<b>14,3%</b>	<b>7</b>	<b>8,9%</b>
<b>N2c</b>	1	4,0%	1	3,2%	1	11,1%	0	0,0%	3	3,8%
<b>Total</b>	25	100,0%	31	100,0%	9	100,0%	14	100,0%	79	100,0%

p-valor = 0,3031

O valor de  $p = 0,3031$ . Assim, não temos associação estatisticamente significativa entre as variáveis.

Tabela 102. Relação das proteínas p53 e/ou p16 com a recidiva

Recidiva	Grupo								Total	
	p53 (-) e p16 (-)		p53 (+) e p16 (-)		p53 (-) e p16 (+)		p53 (+) e p16 (+)		N	%
	N	%	N	%	N	%	N	%		
<b>Não</b>	19	76,0%	20	64,5%	6	66,7%	7	50,0%	52	65,8%
<b>Sim</b>	<b>6</b>	<b>24,0%</b>	<b>11</b>	<b>35,5%</b>	<b>3</b>	<b>33,3%</b>	<b>7</b>	<b>50,0%</b>	<b>27</b>	<b>34,2%</b>
<b>Total</b>	25	100,0%	31	100,0%	9	100,0%	14	100,0%	79	100,0%

p-valor = 0,4434

O valor de  $p = 0,4434$ . Assim, não temos associação estatisticamente significativa entre as variáveis.

Tabela 103. Relação das proteínas p53 e/ou p16 com o óbito geral

Obito3a	Grupo								Total	
	p53 (-) e p16(-)		p53 (+) e p16(-)		p53 (-) e p16(+)		p53 (+) e p16(+)		N	%
	N	%	N	%	N	%	N	%		
<b>Não</b>	21	84,0%	21	67,7%	7	77,8%	9	64,3%	58	73,4%
<b>Sim</b>	<b>4</b>	<b>16,0%</b>	<b>10</b>	<b>32,3%</b>	<b>2</b>	<b>22,2%</b>	<b>5</b>	<b>35,7%</b>	<b>21</b>	<b>26,6%</b>
<b>Total</b>	25	100,0%	31	100,0%	9	100,0%	14	100,0%	79	100,0%

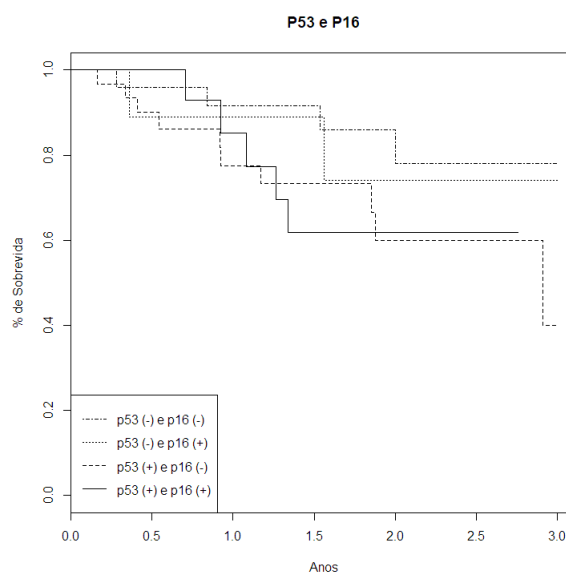
Observamos que 4 (16%) pacientes com ambas proteínas p53 e p16 negativas evoluíram para óbito geral *versus* 10 (32,3%) pacientes com proteína p53 positiva e proteína p16 negativa que evoluíram para óbito geral.

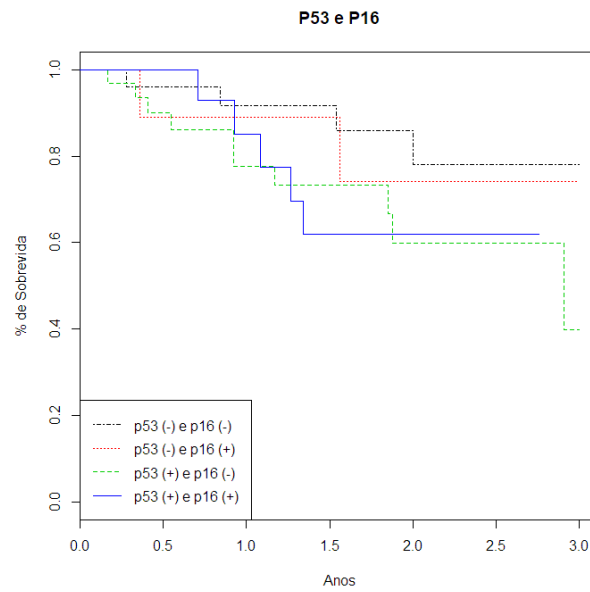
Tabela 104. Relação das proteínas p53 e/ou p16 com o óbito pela doença

Óbito pela doença3a	Grupo								Total	
	p53 (-) e p16(-)		p53 (+) e p16(-)		p53 (-) e p16(+)		p53 (+) e p16(+)			
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Não	21	84,0%	23	74,2%	7	77,8%	10	71,4%	61	77,2%
Sim	4	16,0%	8	25,8%	2	22,2%	4	28,6%	18	22,8%
Total	25	100,0%	31	100,0%	9	100,0%	14	100,0%	79	100,0%

Observamos que 4 (16%) pacientes com ambas proteínas negativa evoluíram para óbito pela doença *versus* 8 (25,8%) pacientes com proteína p53 positiva e proteína p16 negativa que evoluíram para óbito pela doença.

A seguir temos os Gráficos 40 e 41, com as curvas de sobrevivência para óbito geral, calculadas pelo estimador de Kaplan-Meier para cada categoria do p53 e p16.

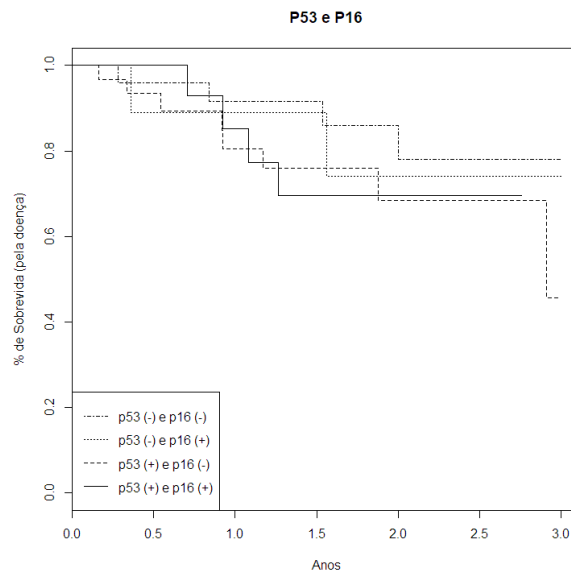


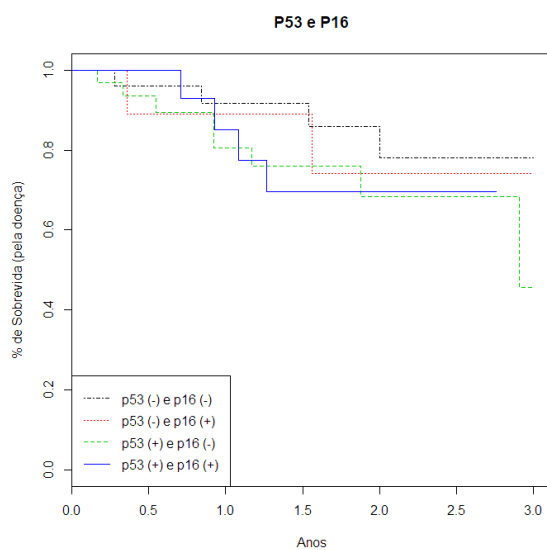


**Gráficos 40 e 41. Sobrevida dos pacientes com as proteínas p53 e/ou p16 – óbito geral**

Temos que o valor de p para o teste de Log-rank foi de 0,3508. Assim, temos que não há diferença entre as curvas de sobrevivência.

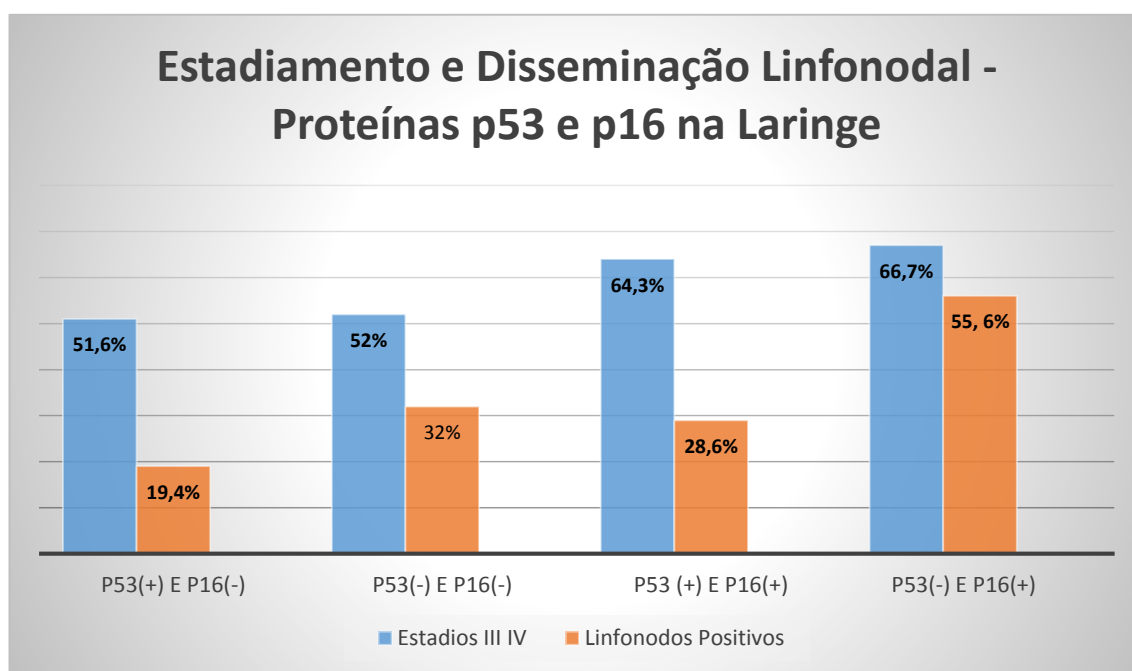
A seguir temos os Gráficos 42 e 43, com as curvas de sobrevivência para óbito pela doença, calculadas pelo estimador de Kaplan-Meier para cada categoria do p53 e p16.



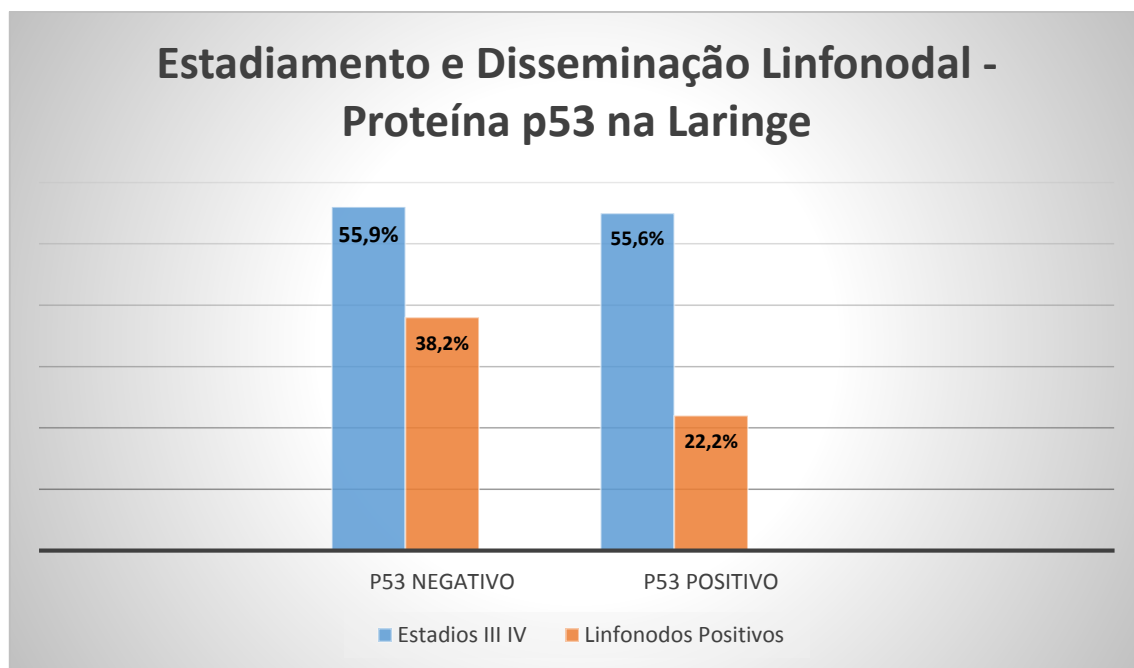


**Gráficos 42 e 43. Sobrevida de pacientes com as proteínas p53 e/ou p16 – óbito pela doença**

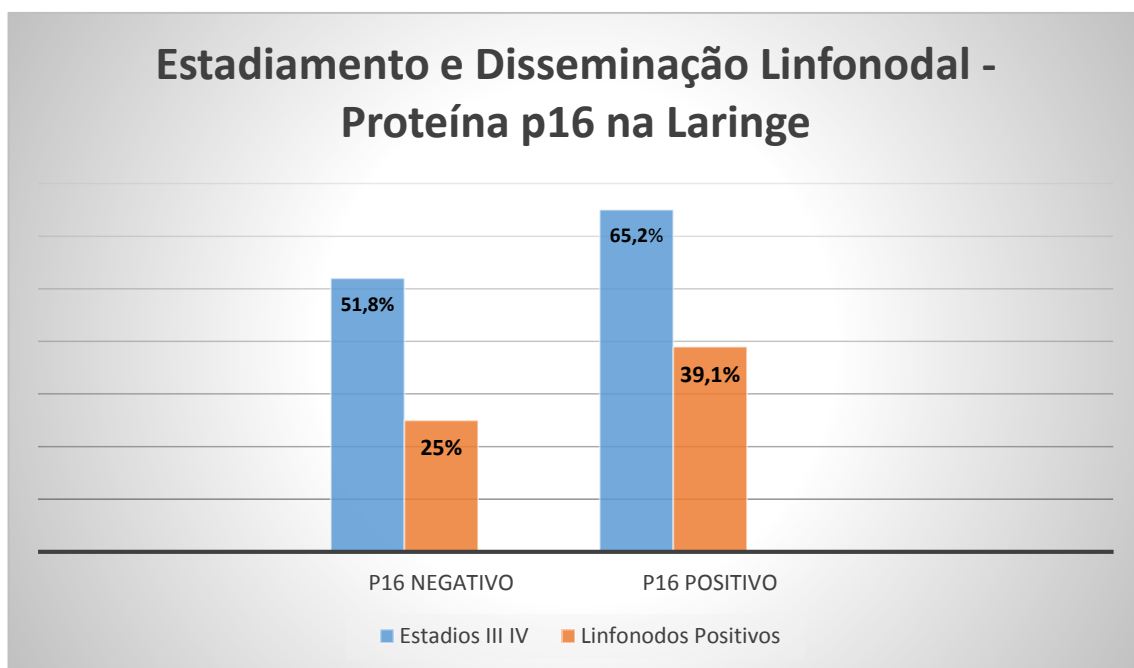
Temos que o valor de p para o teste de Log-rank foi de 0,6391. Assim, temos que não há diferença entre as curvas de sobrevivida.



**Gráfico 44. Estadiamento e disseminação linfonodal da situação das proteínas p53 e p16 – Laringe**



**Gráfico 45. Estadiamento e disseminação linfonodal da situação da proteína p53 – Laringe**



**Gráfico 46. Estadiamento e disseminação linfonodal da situação da proteína p16 – Laringe**

### 4.3 Faringe

Na casuística de 91 pacientes com carcinoma de células escamosas na faringe, 84 (92,3%) eram do gênero masculino e 7 (7,7%) do feminino, com a idade média de

61,08 anos e a mediana de 61 anos. 61 (67%) pacientes eram tabagistas ativos, 21 (23,1%) eram ex-tabagistas e 9 (9,9%) nunca fumaram. 26 (28,6%) pacientes eram etilistas, 50 (54,9%) eram ex-etilistas e 15 (16,5%) não eram etilistas. O consumo de chimarrão foi documentado em 85 (93,4%) pacientes.

No grau de diferenciação do carcinoma de células escamosas, 56 (61,5%) eram carcinomas de células escamosas moderadamente diferenciados, 8 (8,8%) eram carcinomas de células escamosas bem diferenciados e 27 (29,7%) eram carcinomas pouco diferenciados.

Assim, temos:

**Tabela 105. Localização na faringe – subsítios**

Localização	N	%	% dos válidos
<b>Amígdala</b>	<b>24</b>	<b>26,4</b>	<b>26,4</b>
Palato mole e/ou úvula	17	18,7	18,7
Base de língua	16	17,6	17,6
Parede posterior	6	6,6	6,6
<b>Hipofaringe</b>	<b>26</b>	<b>28,6</b>	<b>28,6</b>
Nasofaringe	2	2,2	2,2
Total	91	100,0	100,0

Observamos que em 26 (28,6%) pacientes a localização foi na hipofaringe.

**Tabela 106. Localização na faringe – sítios**

Localização	N	%	% dos válidos
<b>Orofaringe</b>	<b>63</b>	<b>69,2</b>	<b>69,2</b>
Hipofaringe	26	28,6	28,6
Nasofaringe	2	2,2	2,2
Total	91	100,0	100,0

Observamos que em 63 (69,2%) pacientes a localização foi na orofaringe.

**Tabela 107. Relação da frequência da proteína p53 na faringe**

Proteína p53 (+)	N	%	% dos válidos
Negativa	39	42,9	42,9
<b>Positiva</b>	<b>52</b>	<b>57,1</b>	<b>57,1</b>
Total	91	100,0	100,0



Observamos que 52 (57,1%) pacientes têm a proteína p53 positiva.

**Tabela 108. Relação do nível de expressividade da proteína p 53 na faringe**

<b>Proteína p53</b>	N	%	% dos válidos
A	14	15,4	15,4
B	6	6,6	6,6
C	32	35,2	35,2
<b>Negativo</b>	<b>39</b>	<b>42,9</b>	<b>42,9</b>
Total	91	100,0	100,0

Observamos que 39 (42,9%) pacientes têm a proteína p53 negativa.

**Tabela 109. Relação da frequência da proteína p16 na faringe**

<b>Proteína p16 (+)</b>	N	%	% dos válidos
Negativo	60	65,9	65,9
<b>Positivo</b>	<b>31</b>	<b>34,1</b>	<b>34,1</b>
Total	91	100,0	100,0

Observamos que 31 (34,1%) pacientes têm a proteína p16 positiva.

**Tabela 110. Relação do grau de expressividade da proteína p16 na faringe**

<b>Proteína p16</b>	N	%	% dos válidos
Grau 1	21	23,1	23,1
Grau 2	4	4,4	4,4
Grau 3	6	6,6	6,6
<b>Grau 0</b>	<b>60</b>	<b>65,9</b>	<b>65,9</b>
Total	91	100,0	100,0

Observamos que 60 (65,9%) pacientes têm a proteína p16 grau 0.

**Tabela 111. Situação das proteínas p53 e/ou p16 e a frequência**

<b>Grupo</b>	N	%	% dos válidos
P53 (-) e p16 (-)	29	31,9	31,9
<b>P53 (+) e p16 (-)</b>	<b>31</b>	<b>34,1</b>	<b>34,1</b>
P53 (-) e p16 (+)	10	11,0	11,0
P53 (+) e p16 (+)	21	23,1	23,1
Total	91	100,0	100,0

Observamos que 31 (34,1%) pacientes têm a proteína p16 negativa e a proteína p53 positiva.

**Tabela 112. Relação cruzada dos níveis e graus entre as proteínas p53 e p16**

Proteína p16		Proteína p53				Total
		Nível A	Nível B	Nível C	Nível Negativo	
Grau 1	N	3	2	10	6	21
	% por linha	14,3%	9,5%	47,6%	28,6%	100,0%
	% por coluna	21,4%	33,3%	31,3%	15,4%	23,1%
Grau 2	N	1	0	2	1	4
	% por linha	25,0%	0,0%	50,0%	25,0%	100,0%
	% por coluna	7,1%	0,0%	6,3%	2,6%	4,4%
Grau 3	N	2	0	1	3	6
	% por linha	33,3%	0,0%	16,7%	50,0%	100,0%
	% por coluna	14,3%	0,0%	3,1%	7,7%	6,6%
Grau 0	N	8	4	19	29	60
	% por linha	13,3%	6,7%	31,7%	48,3%	100,0%
	% por coluna	57,1%	66,7%	59,4%	74,4%	65,9%
Total	N	14	6	32	39	91
	% por linha	15,4%	6,6%	35,2%	42,9%	100,0%
	% por coluna	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

Relação das proteínas p53 ou p16 com a idade:

**Tabela 113. Relação da proteína p53 com a idade**

Variável	Proteína p53	Média	Mediana	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	1º Quartil	3º Quartil	P-valor
Idade	Negativa	60,41	61,00	10,67	43,00	90,00	53,00	65,00	0,5610
	Positiva	61,58	62,00	8,40	38,00	78,00	57,00	67,00	

**Tabela 114. Relação da proteína p16 com a idade**

Variável	Proteína p16	Média	Mediana	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo	1º Quartil	3º Quartil	P-valor
Idade	Negativa	61,30	62,00	9,68	38,00	90,00	56,00	67,00	0,5629
	Positiva	60,65	61,00	8,99	45,00	77,00	54,50	65,50	

Observamos que não houve diferença significativa entre as proteínas p53 e p16.

## 4.3.1 Em relação à proteína p53

Tabela 115. Relação da proteína p53 com o gênero

Gênero	Proteína p53				Total	
	Negativa		Positiva			
	N	%	N	%	N	%
Masculino	35	89,7%	49	94,2%	84	92,3%
Feminino	4	10,3%	3	5,8%	7	7,7%
Total	39	100,0%	52	100,0%	91	100,0%

p-valor = 0,4564

Observamos que no grupo p53 positivo 49 (94,2%) dos pacientes são do gênero masculino, enquanto que no grupo com p53 negativo temos 35 (89,7%). O valor de  $p = 0,4564$ . Assim, não temos associação estatisticamente significativa entre as variáveis.

Tabela 116. Relação da proteína p53 com os subsítios da faringe

Localização	Proteína p53				Total	
	Negativa		Positiva			
	N	%	N	%	N	%
Amígdala	12	30,8%	12	23,1%	24	26,4%
Palato mole e/ou úvula	7	17,9%	10	19,2%	17	18,7%
Base de língua	9	23,1%	7	13,5%	16	17,6%
Parede posterior	2	5,1%	4	7,7%	6	6,6%
Hipofaringe	9	23,1%	17	32,7%	26	28,6%
Nasofaringe	0	0,0%	2	3,8%	2	2,2%
Total	39	100,0%	52	100,0%	91	100,0%

p-valor = 0,6046

Observamos que no grupo da proteína p53 positiva 12 (23,1%) dos pacientes têm a localização amígdala, enquanto que no grupo com proteína p53 negativa temos 12 (30,8%). O valor de  $p = 0,6046$ . Assim, não temos associação estatisticamente significativa entre as variáveis.

**Tabela 117. Relação da proteína p53 com os sítios da faringe**

Localização	Proteína p53				Total	
	Negativa		Positiva			
	N	%	N	%	N	%
<b>Orofaringe</b>	<b>30</b>	<b>76,9%</b>	<b>33</b>	<b>63,5%</b>	<b>63</b>	<b>69,2%</b>
<b>Hipofaringe</b>	9	23,1%	17	32,7%	26	28,6%
<b>Nasofaringe</b>	0	0,0%	2	3,8%	2	2,2%
<b>Total</b>	39	100,0%	52	100,0%	91	100,0%

p-valor = 0,3477

Observamos que no grupo da proteína p53 positiva 33 (63,5%) dos pacientes têm a localização na orofaringe, enquanto que no grupo com proteína p53 negativa temos 30 (76,9%). O valor de  $p = 0,3477$ . Assim, não temos associação estatisticamente significativa entre as variáveis.

**Tabela 118. Relação da proteína p53 com o tratamento**

Tratamento	Proteína p53				Total	
	Negativa		Positiva			
	N	%	N	%	N	%
<b>Cirurgia</b>	<b>4</b>	<b>10,3%</b>	<b>2</b>	<b>3,8%</b>	<b>6</b>	<b>6,6%</b>
<b>Cirurgia + RT + QT</b>	19	48,7%	21	40,4%	40	44,0%
<b>Cirurgia + RT</b>	0	0,0%	2	3,8%	2	2,2%
<b>Radioterapia exclusiva (curativa)</b>	1	2,6%	0	0,0%	1	1,1%
<b>QT + RT</b>	11	28,2%	19	36,5%	30	33,0%
<b>Tratamento paliativo: RT</b>	4	10,3%	8	15,4%	12	13,2%
<b>Total</b>	39	100,0%	52	100,0%	91	100,0%

p-valor = 0,3994

Observamos que no grupo da proteína p53 positiva 2 (3,8%) dos pacientes têm tratamento somente pela cirurgia, enquanto que no grupo com proteína p53 negativa temos 4 (10,3%). O valor de  $p = 0,3994$ . Assim, não temos associação estatisticamente significativa entre as variáveis.

**Tabela 119. Relação da proteína p53 com a cirurgia no tratamento**

Cirurgia	Proteína p53				Total	
	Negativa		Positiva			
	N	%	N	%	N	%
<b>Não</b>	16	41,0%	27	51,9%	43	47,3%
<b>Sim</b>	<b>23</b>	<b>59,0%</b>	<b>25</b>	<b>48,1%</b>	<b>48</b>	<b>52,7%</b>
<b>Total</b>	39	100,0%	52	100,0%	91	100,0%

p-valor = 0,3965

Observamos que no grupo da proteína p53 positiva 25 (48,1%) dos pacientes têm tratamento por cirurgia, enquanto que no grupo com proteína p53 negativa temos 23 (59%). O valor de  $p = 0,3965$ . Assim, não temos associação estatisticamente significativa entre as variáveis.

**Tabela 120. Relação da proteína p53 com o estadiamento**

Estádio	Proteína p53				Total	
	Negativa		Positiva			
	N	%	N	%	N	%
<b>I, II</b>	9	23,1%	6	11,5%	15	16,5%
<b>III, IV</b>	<b>30</b>	<b>76,9%</b>	<b>46</b>	<b>88,5%</b>	<b>76</b>	<b>83,5%</b>
<b>Total</b>	39	100,0%	52	100,0%	91	100,0%

p-valor = 0,1632

Observamos que no grupo com a proteína p53 positiva 46 (88,5%) dos pacientes têm estágio III, IV, enquanto que no grupo com proteína p53 negativa temos 30 (76,9%). O valor de  $p =$  foi de 0,1632. Assim, não temos associação estatisticamente significativa entre as variáveis.

**Tabela 121. Relação da proteína p53 com o tumor (T)**

Tumor	Proteína p53				Total	
	Negativa		Positiva			
	N	%	N	%	N	%
<b>T1</b>	6	15,4%	10	19,2%	16	17,6%
<b>T2</b>	17	43,6%	14	26,9%	31	34,1%
<b>T3</b>	11	28,2%	15	28,8%	26	28,6%
<b>T4</b>	<b>5</b>	<b>12,8%</b>	<b>13</b>	<b>25,0%</b>	<b>18</b>	<b>19,8%</b>
<b>Total</b>	39	100,0%	52	100,0%	91	100,0%

p-valor = 0,3010

Observamos que no grupo com a proteína p53 positiva 13 (25,0%) dos pacientes têm tumor T4, enquanto que no grupo com a proteína p53 negativa temos 5 (12,8%). O valor de  $p = 0,3010$ . Assim, não temos associação estatisticamente significativa entre as variáveis.

**Tabela 122. Relação da proteína p53 com a disseminação linfonodal**

Linfonodos	Proteína p53				Total	
	Negativa		Positiva			
	N	%	N	%	N	%
Positivos	29	74,4%	41	78,8%	70	76,9%
Negativos	10	25,6%	11	21,2%	21	23,1%
Total	39	100,0%	52	100,0%	91	100,0%

p-valor = 0,6252

Observamos que no grupo com a p53 positiva 41 (78,8%) dos pacientes têm linfonodos positivos, enquanto que no grupo com a proteína p53 negativa temos 29 (74,4%). O valor de  $p = 0,6252$ . Desse modo, não temos associação estatisticamente significativa entre as variáveis.

**Tabela 123. Relação da proteína p53 com o linfonodo (N)**

Linfonodos	Proteína p53				Total	
	Negativa		Positiva			
	N	%	N	%	N	%
N0	10	25,6%	11	21,2%	21	23,1%
N1	8	20,5%	9	17,3%	17	18,7%
N2a	4	10,3%	8	15,4%	12	13,2%
N2b	13	33,3%	10	19,2%	23	25,3%
N2c	3	7,7%	12	23,1%	15	16,5%
N3	1	2,6%	2	3,8%	3	3,3%
Total	39	100,0%	52	100,0%	91	100,0%

p-valor = 0,3137

Observamos que no grupo com a proteína p53 positiva 2 (3,8%) dos pacientes têm linfonodos N3, enquanto que no grupo com a proteína p53 negativa temos 1 (2,6%). O valor de  $p = 0,3137$ . Assim, não temos associação estatisticamente significativa entre as variáveis.

**Tabela 124. Relação da proteína p53 com a recidiva**

Recidiva	Proteína p53				Total	
	Negativa		Positiva			
	N	%	N	%	N	%
<b>Não</b>	11	28,2%	20	38,5%	31	34,1%
<b>Sim</b>	28	71,8%	32	61,5%	60	65,9%
<b>Total</b>	39	100,0%	52	100,0%	91	100,0%

p-valor = 0,3741

Observamos que no grupo com a proteína p53 positiva 20 (38,5%) dos pacientes não tiveram recidiva, enquanto que no grupo com a proteína p53 negativa temos 11 (28,2%). O valor de  $p = 0,3741$ . Assim, não temos associação estatisticamente significativa entre as variáveis.

**Tabela 125. Relação da proteína p53 com mais de um tumor primário na CP**

Mais de um tumor	Proteína p53				Total	
	Negativa		Positiva			
	N	%	N	%	N	%
<b>Sincrônico CP</b>	3	7,7%	1	1,9%	4	4,4%
<b>Metacrônico CP</b>	12	30,8%	6	11,5%	18	19,8%
<b>Não</b>	24	61,5%	45	86,5%	69	75,8%
<b>Total</b>	39	100,0%	52	100,0%	91	100,0%

p-valor = 0,0136

Observamos que no grupo da proteína p53 positiva 45 (86,5%) dos pacientes não têm mais de um tumor, enquanto que no grupo com a proteína p53 negativa temos 24 (61,5%). O valor de  $p = 0,0136$ . Assim, temos associação estatisticamente significativa entre as variáveis.

**Tabela 126. Relação da proteína p53 com óbito geral**

Óbito 3ª	Proteína p53				Total	
	Negativa		Positiva			
	N	%	N	%	N	%
<b>Não</b>	17	43,6%	25	48,1%	42	46,2%
<b>Sim</b>	22	56,4%	27	51,9%	49	53,8%
<b>Total</b>	39	100,0%	52	100,0%	91	100,0%

Observamos que 27 (51,9%) pacientes com a proteína p53 positiva foram ao óbito geral *versus* 22 (56,4%) dos pacientes com a proteína p53 negativa evoluíram para óbito geral.

**Tabela 127. Relação da proteína p53 com o óbito pela doença**

Óbito pela doença 3a	Proteína p53				Total	
	Negativo		Positivo			
	N	%	N	%	N	%
Não	20	51,3%	25	48,1%	45	49,5%
<b>Sim</b>	<b>19</b>	<b>48,7%</b>	<b>27</b>	<b>51,9%</b>	<b>46</b>	<b>50,5%</b>
Total	39	100,0%	52	100,0%	91	100,0%

Observamos que 27 (51,9%) pacientes com a proteína p53 positiva foram ao óbito pela doença *versus* 19 (48,7%) pacientes com a proteína p53 negativa evoluíram para óbito pela doença.

**Tabela 128. Relação do nível da proteína p53 com o óbito geral**

Óbito 3a	Proteína p53								Total	
	A		B		C		Negativo			
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Não	9	64,3%	3	50,0%	13	40,6%	17	43,6%	42	46,2%
<b>Sim</b>	<b>5</b>	<b>35,7%</b>	<b>3</b>	<b>50,0%</b>	<b>19</b>	<b>59,4%</b>	<b>22</b>	<b>56,4%</b>	<b>49</b>	<b>53,8%</b>
Total	14	100,0%	6	100,0%	32	100,0%	39	100,0%	91	100,0%

Observamos 22 (56,4%) pacientes com proteína p53 negativa evoluíram para óbito geral e 19 (59,4%) pacientes com proteína p53 positiva nível C apresentaram evolução para óbito geral.

**Tabela 129. Relação do nível da proteína p53 com o óbito pela doença**

Óbito pela doença 3ª	Proteína p53								Total	
	A		B		C		Negativo			
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Não	9	64,3%	3	50,0%	13	40,6%	20	51,3%	45	49,5%
<b>Sim</b>	<b>5</b>	<b>35,7%</b>	<b>3</b>	<b>50,0%</b>	<b>19</b>	<b>59,4%</b>	<b>19</b>	<b>48,7%</b>	<b>46</b>	<b>50,5%</b>
Total	14	100,0%	6	100,0%	32	100,0%	39	100,0%	91	100,0%



Observamos que 19 (48,7%) pacientes com a proteína p53 negativa evoluíram para óbito pela doença e 19 (59,4%) pacientes com a proteína p53 positiva nível C evoluíram para óbito pela doença.

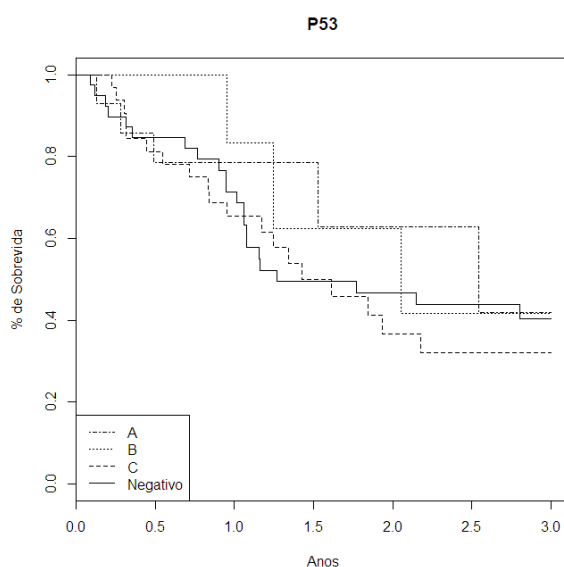
Observação: 14 pacientes p53 positiva nível A havia 3 (21,4%) pacientes com a proteína p16 positiva grau 1, 1 (7,1%) paciente com a proteína p16 positiva grau 2, 2 (14,3%) pacientes com a proteína p16 positiva grau 3 e 8 (57,1%) pacientes com a proteína p16 grau 0.

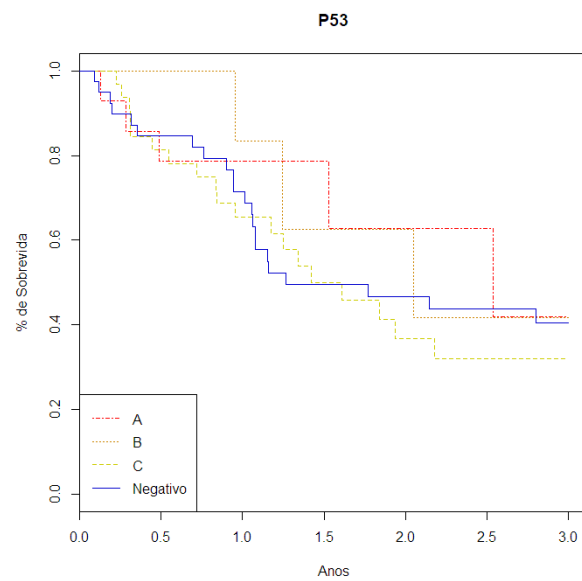
6 pacientes p53 positiva nível B havia 2 (33,3%) pacientes com a proteína p16 positiva grau 1, nenhum paciente com p16 positiva grau 2 e grau 3, e 4 (66,7%) pacientes com a proteína p16 grau 0.

32 pacientes p53 positiva nível C havia 10 (31,3%) pacientes com a proteína p16 positiva grau 1, 2 (6,3%) pacientes com a proteína p16 positiva grau 2, 1 (3,1%) paciente com a proteína p16 positiva grau 3 e 19 (59,4%) pacientes com a proteína p16 grau 0.

39 pacientes p53 negativa havia 6 (15,4%) pacientes com a proteína p16 positiva grau 1, 1 (2,6%) paciente com a proteína p16 positiva grau 2, 3 (7,7%) pacientes com a proteína p16 grau 3 e 29 (74,4%) pacientes p16 grau 0.

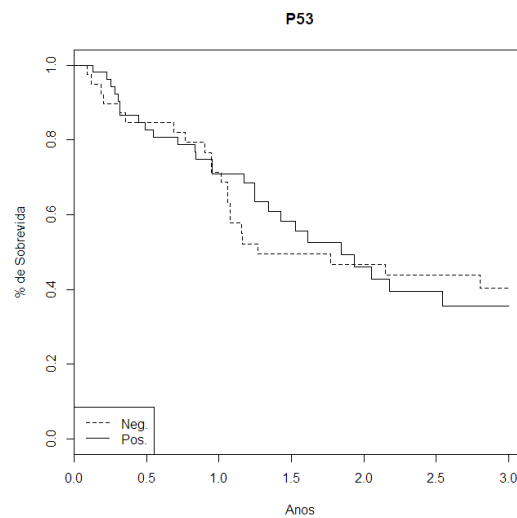
A seguir temos os Gráficos 47 e 48, com as curvas de sobrevivência para óbito geral, calculadas pelo estimador de Kaplan-Meier para cada nível da proteína p53.

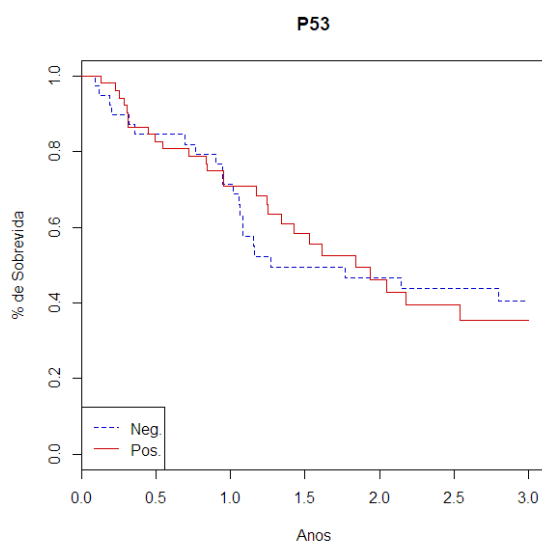




**Gráficos 47 e 48. Relação do nível da proteína p53 com a sobrevida dos pacientes – óbito geral**

Temos que o valor de  $p$  para o teste de Log-rank foi de 0,7163. Assim, temos que não há diferença entre as curvas de sobrevida.





**Gráficos 49 e 50. Relação da sobrevivida dos pacientes com proteína p53 – óbito geral**

Temos que o valor de  $p$  para o teste de Log-rank foi de 0,9630. Assim, temos que não há diferença entre as curvas de sobrevivida.

**Tabela 130. Modelo de Cox univariado da proteína p53: óbito geral**

Variável	H.R.	IC (95%)		P-valor
		Lim. Inf	Lim. Sup.	
p53 (+)	0,987	0,560	1,737	0,9631

Observamos que o H.R. foi de aproximadamente 0,99. Assim temos que pacientes com a proteína p53 positiva tem 0,99 vezes mais chances de evoluir para óbito geral do que os pacientes com a proteína p53 negativa. O valor de  $p = 0,9631$  sendo não significativo.

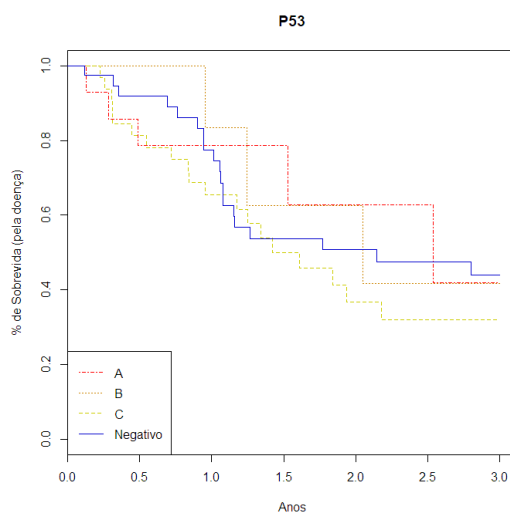
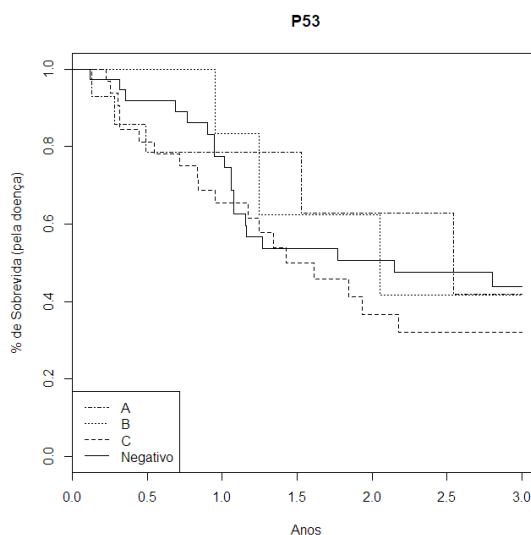
**Tabela 131. Modelo de Cox da proteína p53 ajustado pelo sexo e idade**

Variável	H.R.	IC (95%)		P-valor
		Lim. Inf	Lim. Sup.	
p53 (+)	1,001	0,568	1,763	0,9981

Observamos que o H.R. foi de aproximadamente 1,0. Assim, temos que pacientes com a proteína p53 positiva tem 1,00 vez mais chances de evoluir para óbito

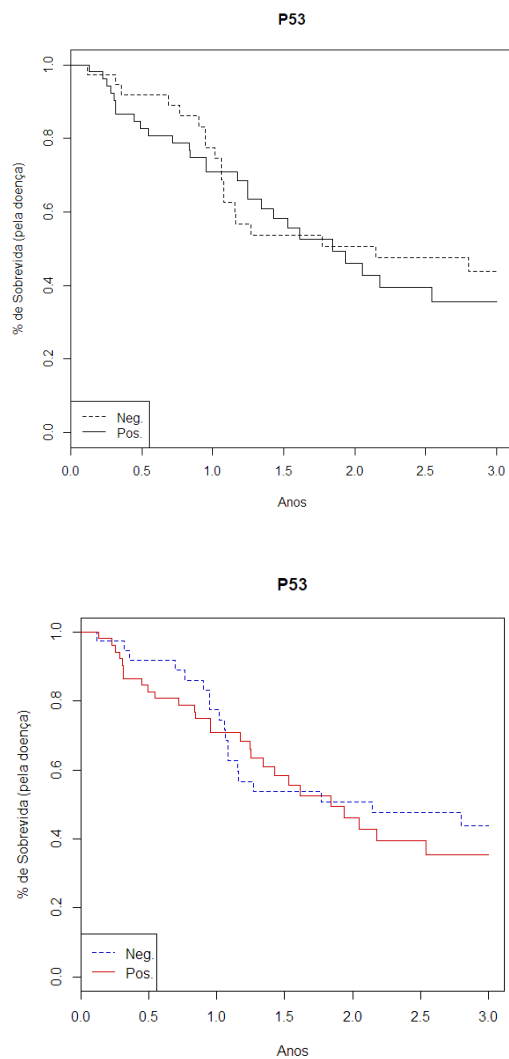
geral do que os pacientes com a proteína p53 negativa. O valor de  $p = 0,9981$  sendo não significativo.

A seguir temos os Gráficos 51 e 52, com as curvas de sobrevivência para óbito pela doença, calculadas pelo estimador de Kaplan-Meier para cada categoria do p53.



**Gráficos 51 e 52. Relação do nível da proteína p53 com a sobrevida dos pacientes – óbito pela doença**

Temos que o valor de  $p$  para o teste de Log-rank foi de 0,6337. Assim, temos que não há diferença entre as curvas de sobrevida.



**Gráficos 53 e 54. Relação da sobrevida dos pacientes com a proteína p53 – óbito pela doença**

Temos que o valor de p para o teste de Log-rank foi de 0,6378. Assim, temos que não há diferença entre as curvas de sobrevida.

A seguir, temos:

**Tabela 132. Modelo de Cox univariado da proteína p53: óbito pela doença**

Variável	H.R.	IC (95%)		P-valor
		Lim. Inf	Lim. Sup.	
<b>p53 (+)</b>	<b>1,152</b>	<b>0,638</b>	<b>2,078</b>	<b>0,6385</b>

Observamos que o H.R. foi de aproximadamente 1,15. Assim temos que pacientes com a proteína p53 positiva tem 1,15 vezes mais chances de evoluir para

óbito pela doença do que os pacientes com a proteína p53 negativa. O valor de  $p = 0,6385$  sendo não significativo.

**Tabela 133. Modelo de Cox da proteína p53 ajustado pelo sexo e idade**

Variável	H.R.	IC (95%)		P-valor
		Lim. Inf	Lim. Sup.	
p53 (+)	1,167	0,645	2,109	0,6095

Observamos que o H.R. foi de aproximadamente 1,17. Assim temos que pacientes com a proteína p53 positiva tem 1,17 vezes mais chances de evoluir para óbito pela doença do que os pacientes com a proteína p53 negativa. O valor de  $p = 0,6095$  sendo não significativo.

#### 4.3.2 Em relação à proteína p16

**Tabela 134. Relação da proteína p16 com o gênero**

Gênero	Proteína p16				Total	
	Negativa		Positiva			
	N	%	N	%	N	%
Masculino	55	91,7%	29	93,5%	84	92,3%
Feminino	5	8,3%	2	6,5%	7	7,7%
Total	60	100,0%	31	100,0%	91	100,0%

p-valor = 1,0000

Observamos que no grupo p16 positivo 29 (93,5%) dos pacientes são do gênero masculino, enquanto que no grupo com p16 negativo temos 55 (91,7%). O valor de  $p = 1,0000$ . Assim, não temos associação estatisticamente significativa entre as variáveis.

Tabela 135. Relação da proteína p 16 com os subsítios da faringe

Localização	Proteína p16				Total	
	Negativa		Positiva			
	N	%	N	%	N	%
<b>Amígdala</b>	<b>17</b>	<b>28,3%</b>	<b>7</b>	<b>22,6%</b>	<b>24</b>	<b>26,4%</b>
<b>Palato mole e/ou úvula</b>	9	15,0%	8	25,8%	17	18,7%
<b>Base de língua</b>	10	16,7%	6	19,4%	16	17,6%
<b>Parede posterior</b>	2	3,3%	4	12,9%	6	6,6%
<b>Hipofaringe</b>	20	33,3%	6	19,4%	26	28,6%
<b>Nasofaringe</b>	2	3,3%	0	0,0%	2	2,2%
<b>Total</b>	60	100,0%	31	100,0%	91	100,0%

p-valor = 0,2545

Observamos que no grupo da proteína p16 positiva 7 (22,6%) dos pacientes têm localização no amígdala, enquanto que no grupo com proteína p16 negativa temos 17 (28,3%). O valor de  $p = 0,2545$ . Assim, não temos associação estatisticamente significativa entre as variáveis.

Tabela 136. Relação da proteína p16 com os sítios da faringe

Localização	Proteína p16				Total	
	Negativa		Positiva			
	N	%	N	%	N	%
<b>Orofaringe</b>	<b>38</b>	<b>63,3%</b>	<b>25</b>	<b>80,6%</b>	<b>63</b>	<b>69,2%</b>
Hipofaringe	20	33,3%	6	19,4%	26	28,6%
Nasofaringe	2	3,3%	0	0,0%	2	2,2%
Total	60	100,0%	31	100,0%	91	100,0%

p-valor = 0,2449

Observamos que no grupo da proteína p16 positiva 25 (80,6%) dos pacientes têm localização no orofaringe, enquanto que no grupo com a proteína p16 negativa temos 38 (63,3%). O valor de  $p = 0,2449$ . Assim, não temos associação estatisticamente significativa entre as variáveis.

Tabela 137. Relação da proteína p 16 com o tratamento

Tratamento	Proteína p16				Total	
	Negativa		Positiva			
	N	%	N	%	N	%
<b>Cirurgia</b>	<b>5</b>	<b>8,3%</b>	<b>1</b>	<b>3,2%</b>	<b>6</b>	<b>6,6%</b>
<b>Cirurgia + RT + QT</b>	<b>20</b>	<b>33,3%</b>	<b>20</b>	<b>64,5%</b>	<b>40</b>	<b>44,0%</b>
<b>Cirurgia + RT</b>	<b>1</b>	<b>1,7%</b>	<b>1</b>	<b>3,2%</b>	<b>2</b>	<b>2,2%</b>
<b>Radioterapia exclusiva</b>	<b>1</b>	<b>1,7%</b>	<b>0</b>	<b>0,0%</b>	<b>1</b>	<b>1,1%</b>
<b>QT + RT</b>	<b>23</b>	<b>38,3%</b>	<b>7</b>	<b>22,6%</b>	<b>30</b>	<b>33,0%</b>
<b>Tratamento paliativo -RT</b>	<b>10</b>	<b>16,7%</b>	<b>2</b>	<b>6,5%</b>	<b>12</b>	<b>13,2%</b>
<b>Total</b>	<b>60</b>	<b>100,0%</b>	<b>31</b>	<b>100,0%</b>	<b>91</b>	<b>100,0%</b>

p-valor = 0,0705

Observamos que no grupo com a proteína p16 positiva 1 (3,2%) paciente tem tratamento por cirurgia exclusivamente, enquanto que no grupo com proteína p16 atemos 5 (8,3%). O valor de  $p = 0,0705$ . Assim, não temos associação estatisticamente significativa entre as variáveis.

Tabela 138. Relação da proteína p16 com a cirurgia no tratamento

Cirurgia	Proteína p16				Total	
	Negativa		Positiva			
	N	%	N	%	N	%
<b>Não</b>	<b>34</b>	<b>56,7%</b>	<b>9</b>	<b>29,0%</b>	<b>43</b>	<b>47,3%</b>
<b>Sim</b>	<b>26</b>	<b>43,3%</b>	<b>22</b>	<b>71,0%</b>	<b>48</b>	<b>52,7%</b>
<b>Total</b>	<b>60</b>	<b>100,0%</b>	<b>31</b>	<b>100,0%</b>	<b>91</b>	<b>100,0%</b>

p-valor = 0,0153

Observamos que no grupo com proteína p16 positiva 22 (71,0%) dos pacientes têm tratamento por cirurgia, enquanto que no grupo com proteína p16 negativa temos 26 (43,3%). O p-valor foi de 0,0153. Assim, temos associação estatisticamente significativa entre as variáveis.

Tabela 139. Relação da proteína p16 com o estadiamento

Estádio	Proteína p16				Total	
	Negativa		Positiva			
	N	%	N	%	N	%
<b>I II</b>	<b>10</b>	<b>16,7%</b>	<b>5</b>	<b>16,1%</b>	<b>15</b>	<b>16,5%</b>
<b>III IV</b>	<b>50</b>	<b>83,3%</b>	<b>26</b>	<b>83,9%</b>	<b>76</b>	<b>83,5%</b>
<b>Total</b>	<b>60</b>	<b>100,0%</b>	<b>31</b>	<b>100,0%</b>	<b>91</b>	<b>100,0%</b>

p-valor = 1,0000



Observamos que no grupo com a proteína p16 positiva 26 (83,9%) dos pacientes têm estágio III, IV, enquanto que no grupo com proteína p16 negativa temos 50 (83,3%). O valor de  $p = 1,0000$ . Assim, não temos associação estatisticamente significativa entre as variáveis.

**Tabela 140. Relação da proteína p16 com o tumor (T)**

Tumor	Proteína p16				Total	
	Negativa		Positiva			
	N	%	N	%	N	%
<b>T1</b>	<b>6</b>	<b>10,0%</b>	<b>10</b>	<b>32,3%</b>	<b>16</b>	<b>17,6%</b>
<b>T2</b>	21	35,0%	10	32,3%	31	34,1%
<b>T3</b>	18	30,0%	8	25,8%	26	28,6%
<b>T4</b>	15	25,0%	3	9,7%	18	19,8%
<b>Total</b>	60	100,0%	31	100,0%	91	100,0%

p-valor = 0,0464

Observamos que no grupo com proteína p16 positiva 10 (32,3%) dos pacientes têm tumor T1, enquanto que no grupo com proteína p16 negativa temos 6 (10,0%). O valor de  $p = 0,0464$ . Assim, temos associação estatisticamente significativa entre as variáveis.

**Tabela 141. Relação da proteína p16 com a disseminação linfonodal**

Linfonodos	Proteína p16				Total	
	Negativa		Positiva			
	N	%	N	%	N	%
<b>Positivos</b>	<b>45</b>	<b>75,0%</b>	<b>25</b>	<b>80,6%</b>	<b>70</b>	<b>76,9%</b>
<b>Negativos</b>	15	25,0%	6	19,4%	21	23,1%
<b>Total</b>	60	100,0%	31	100,0%	91	100,0%

p-valor = 0,6090

Observamos que no grupo da proteína p16 positiva 25 (80,6%) dos pacientes têm linfonodos positivos enquanto que no grupo com a proteína p16 negativa temos 45 (75,0%). O valor de  $p = 0,6090$ . Assim, não temos associação estatisticamente significativa entre as variáveis.

**Tabela 142. Relação da proteína p16 com linfonodo (N)**

Linfonodos	Proteína p16				Total	
	Negativa		Positiva			
	N	%	N	%	N	%
<b>N0</b>	15	25,0%	6	19,4%	21	23,1%
<b>N1</b>	9	15,0%	8	25,8%	17	18,7%
<b>N2a</b>	7	11,7%	5	16,1%	12	13,2%
<b>N2b</b>	18	30,0%	5	16,1%	23	25,3%
<b>N2c</b>	9	15,0%	6	19,4%	15	16,5%
<b>N3</b>	<b>2</b>	<b>3,3%</b>	<b>1</b>	<b>3,2%</b>	<b>3</b>	<b>3,3%</b>
<b>Total</b>	60	100,0%	31	100,0%	91	100,0%

p-valor = 0,5745

Observamos que no grupo com a proteína p16 positiva 1 (3,2%) dos pacientes tem linfonodos N3, enquanto que no grupo com a proteína p16 negativa temos 2 (3,3%). O valor de  $p = 0,5745$ . Assim, não temos associação estatisticamente significativa entre as variáveis

**Tabela 143. Relação da proteína p16 com a recidiva**

Recidiva	Proteína p16				Total	
	Negativa		Positiva			
	N	%	N	%	N	%
<b>Não</b>	<b>17</b>	<b>28,3%</b>	<b>14</b>	<b>45,2%</b>	<b>31</b>	<b>34,1%</b>
<b>Sim</b>	43	71,7%	17	54,8%	60	65,9%
<b>Total</b>	60	100,0%	31	100,0%	91	100,0%

p-valor = 0,1608

Observamos que no grupo com a proteína p16 positiva 14 (45,2%) dos pacientes não tiveram recidiva, enquanto que no grupo com a proteína p16 negativa temos 17 (28,3%). O valor de  $p = 0,1608$ . Desse modo, não temos associação estatisticamente significativa entre as variáveis.

**Tabela 144. Relação da proteína p16 com o óbito geral**

Óbito 3a	Proteína p16				Total	
	Negativa		Positiva			
	N	%	N	%	N	%
<b>Não</b>	26	43,3%	16	51,6%	42	46,2%
<b>Sim</b>	<b>34</b>	<b>56,7%</b>	<b>15</b>	<b>48,4%</b>	<b>49</b>	<b>53,8%</b>
<b>Total</b>	60	100,0%	31	100,0%	91	100,0%

Observamos 15 (48,4%) dos pacientes com proteína p16 positiva evoluíram para óbito geral *versus* 34 (56,7%) dos pacientes com a proteína p16 negativa.

**Tabela 145. Relação da proteína p16 com o óbito pela doença**

Óbito pela doença 3ª	Proteína p16				Total	
	Negativo		Positivo			
	N	%	N	%	N	%
Não	29	48,3%	16	51,6%	45	49,5%
<b>Sim</b>	<b>31</b>	<b>51,7%</b>	<b>15</b>	<b>48,4%</b>	<b>46</b>	<b>50,5%</b>
Total	60	100,0%	31	100,0%	91	100,0%

Observamos 15 (48,4%) dos pacientes com proteína p16 positiva evoluíram para óbito pela doença *versus* 31 (51,7%) dos pacientes com a proteína p16 negativa.

**Tabela 146. Relação do grau da proteína p16 com óbito geral**

Óbito 3a	Proteína p16								Total	
	Grau 1		Grau 2		Grau 3		Grau 0			
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Não	9	42,9%	3	75,0%	4	66,7%	26	43,3%	42	46,2%
Sim	12	57,1%	1	25,0%	2	33,3%	34	56,7%	49	53,8%
Total	21	100,0%	4	100,0%	6	100,0%	60	100,0%	91	100,0%

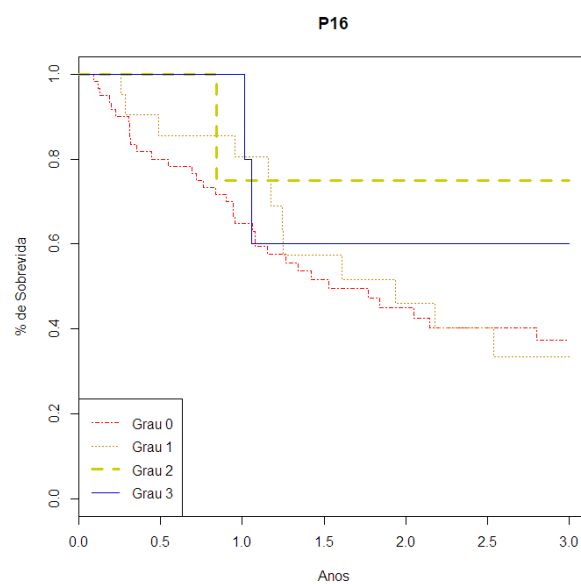
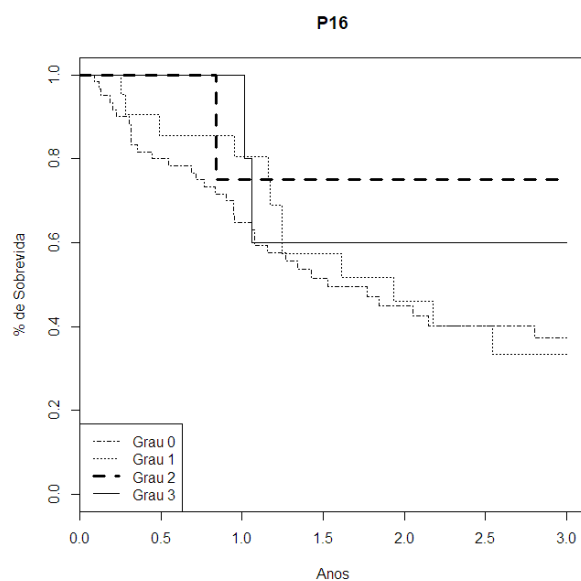
Observamos 1 (25%) dos pacientes com proteína p16 positiva grau 2 evoluiu para óbito geral *versus* 34 (56,7%) pacientes com proteína p16 grau 0 evoluíram para óbito geral.

**Tabela 147. Relação do grau da proteína p16 com óbito pela doença**

Óbito pela doença 3ª	Proteína p16								Total	
	Grau 1		Grau 2		Grau 3		Grau 0			
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Não	9	42,9%	3	75,0%	4	66,7%	29	48,3%	45	49,5%
Sim	12	57,1%	1	25,0%	2	33,3%	31	51,7%	46	50,5%
Total	21	100,0%	4	100,0%	6	100,0%	60	100,0%	91	100,0%

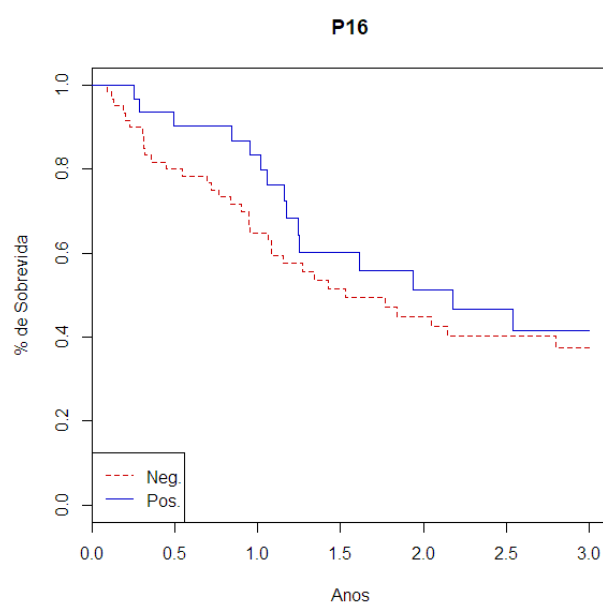
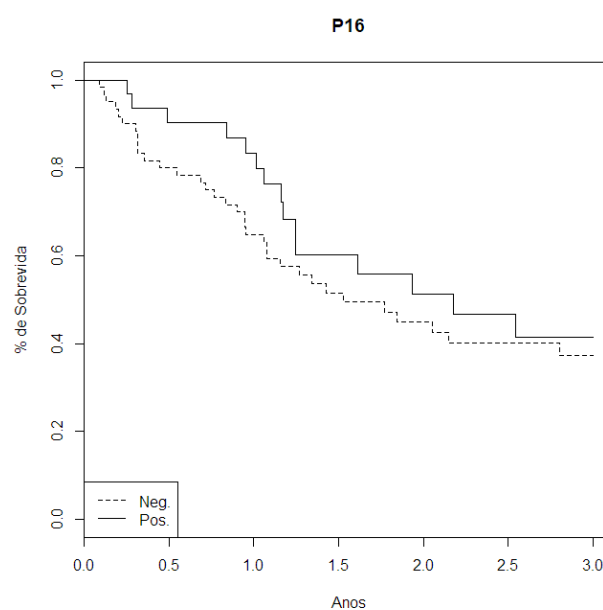
Observamos 1 (25%) dos pacientes com proteína p16 positiva grau 2 evoluiu para óbito pela doença *versus* 31 (51,7%) pacientes com proteína p16 grau 0 evoluíram para óbito pela doença.

A seguir temos os gráficos com as curvas de sobrevivência para óbito geral, calculadas pelo estimador de Kaplan-Meier para cada categoria do p16.



**Gráficos 55 e 56. Relação do grau da proteína p16 da sobrevida dos pacientes – óbito geral**

Temos que o valor de p para o teste de Log-rank foi de 0,6637. Assim, temos que não há diferença entre as curvas de sobrevida.



**Gráficos 57e 58. Relação da sobrevida dos pacientes com a proteína p16 – óbito geral**

Temos que o valor de p para o teste de Log-rank foi de 0,3805. Assim, temos que não há diferença entre as curvas de sobrevida.

**Tabela 148. Modelo de Cox univariado da proteína p16: óbito geral**

Variável	H.R.	IC (95%)		P-valor
		Lim. Inf	Lim. Sup.	
<b>p16 (+)</b>	<b>0,763</b>	<b>0,415</b>	<b>1,401</b>	<b>0,3825</b>

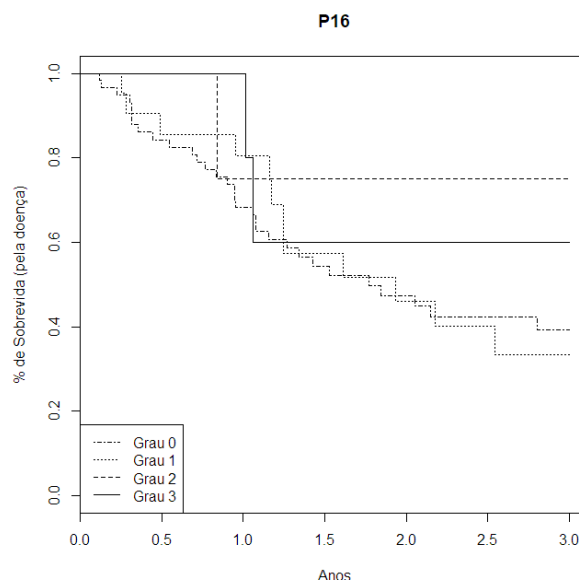
Observamos que o H.R. foi de aproximadamente 0,8. Assim temos que paciente com proteína p16 positiva tem 0,8 vezes mais chances de evoluir para óbito geral do que os pacientes com proteína p16 negativa. O valor de  $p = 0,3825$  sendo não significativo.

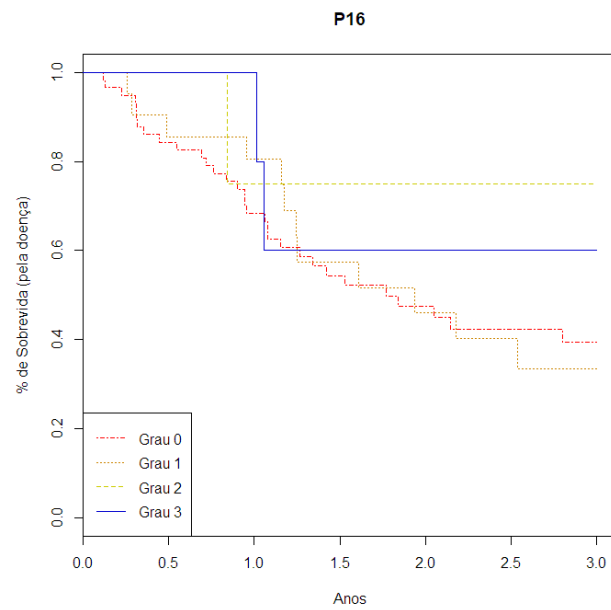
**Tabela 149. Modelo de Cox da proteína p16 ajustado pelo sexo e idade**

Variável	H.R.	IC (95%)		P-valor
		Lim. Inf	Lim. Sup.	
<b>p16 (+)</b>	<b>0,756</b>	<b>0,412</b>	<b>1,389</b>	<b>0,3675</b>

Observamos que o H.R. foi de aproximadamente 0,8. Assim temos que pacientes com proteína p16 positiva tem 0,8 vezes mais chances de evoluir para óbito geral do que os pacientes com a proteína p16 negativa. O valor de  $p = 0,3675$  sendo não significativo.

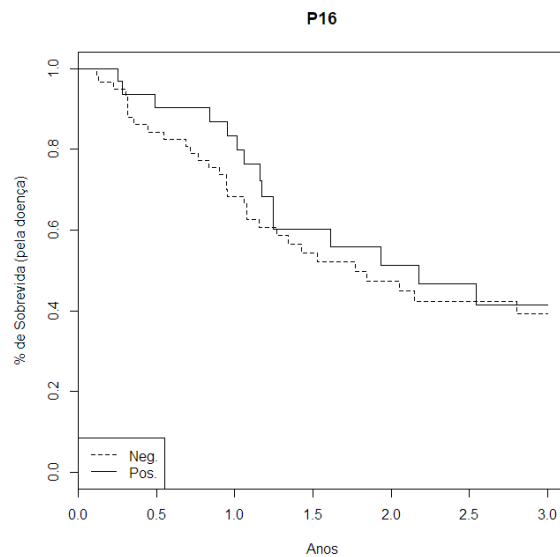
A seguir temos os gráficos com as curvas de sobrevivência para óbito pela doença, calculadas pelo estimador de Kaplan-Meier para cada grau do p16 (Gráficos 59 e 60).

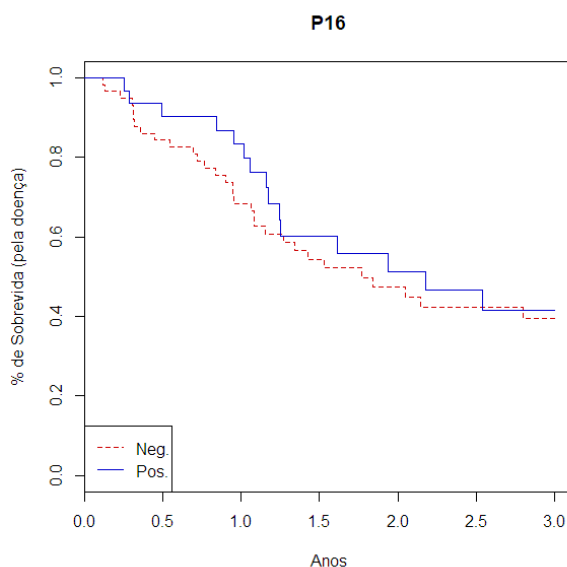




**Gráficos 59 e 60. Relação do grau da proteína p16 com a sobrevida dos pacientes – óbito pela doença**

Temos que o valor de  $p$  para o teste de Log-rank foi de 0,7533. Assim, temos que não há diferença entre as curvas de sobrevida.





**Gráficos 61 e 62. Relação da sobrevivida dos pacientes com a proteína p16 – óbito pela doença**

Temos que o valor de  $p$  para o teste de Log-rank foi de 0,5598. Assim, temos que não há diferença entre as curvas de sobrevivida.

**Tabela 150. Modelo de Cox univariado da proteína p16: óbito pela doença**

Variável	H.R.	IC (95%)		P-valor
		Lim. Inf	Lim. Sup.	
<b>p16 (+)</b>	<b>0,833</b>	<b>0,449</b>	<b>1,543</b>	<b>0,5608</b>

Observamos que o H.R. foi de aproximadamente 0,8. Assim temos que pacientes com a proteína p16 positiva têm 0,8 vezes mais chances de evoluir para óbito pela doença do que os pacientes com a proteína p16 negativa. O valor de  $p = 0,5608$  sendo não significativo.

**Tabela 151. Modelo de Cox da proteína p16 ajustado pelo sexo e idade**

Variável	H.R.	IC (95%)		P-valor
		Lim. Inf	Lim. Sup.	
<b>p16 (+)</b>	<b>0,829</b>	<b>0,447</b>	<b>1,537</b>	<b>0,5521</b>

Observamos que o H.R. foi de aproximadamente 0,83. Assim temos que pacientes com proteína p16 positiva tem 0,83 vezes mais chances de evoluir para óbito pela doença do que os pacientes com a proteína p16 negativa. O valor de  $p = 0,5521$  sendo não significativo.



## 4.3.3 Situação das proteínas p53 e p16 isoladas ou associadas

Tabela 152. Relação das proteínas p53 e/ou p16 com a localização

Localização	Grupo								Total	
	p53 (-) e p16 (-)		p53 (+) e p16 (-)		p53 (-) e p16 (+)		p53 (+) e p16 (+)		N	%
	N	%	N	%	N	%	N	%		
Orofaringe	21	72,4%	17	54,8%	9	90,0%	16	76,2%	63	69,2%
Hipofaringe	8	27,6%	12	38,7%	1	10,0%	5	23,8%	26	28,6%
Nasofaringe	0	0,0%	2	6,5%	0	0,0%	0	0,0%	2	2,2%
<b>Total</b>	29	100,0%	31	100,0%	10	100,0%	21	100,0%	91	100,0%

p-valor = 0,2794

O valor de  $p = 0,2794$ . Assim, não temos associação estatisticamente significativa entre as variáveis.

Tabela 153. Relação das proteínas p53 e/ou p16 com o estadiamento

Estádio	Grupo								Total	
	p53 (-) e p16 (-)		p53 (+) e p16 (-)		p53 (-) e p16 (+)		p53 (+) e p16 (+)		N	%
	N	%	N	%	N	%	N	%		
I II	6	20,7%	4	12,9%	3	30,0%	2	9,5%	15	16,5%
III IV	23	79,3%	27	87,1%	7	70,0%	19	90,5%	76	83,5%
<b>Total</b>	29	100,0%	31	100,0%	10	100,0%	21	100,0%	91	100,0%

p-valor = 0,4227

O valor de  $p = 0,4227$ . Assim, não temos associação estatisticamente significativa entre as variáveis.

Tabela 154. Relação das proteínas p53 e/ou p16 com o tumor (T)

Tumor	Grupo								Total	
	p53 (-) e p16 (-)		p53 (+) e p16 (-)		p53 (-) e p16 (+)		p53 (+) e p16 (+)		N	%
	N	%	N	%	N	%	N	%		
T1	2	6,9%	4	12,9%	4	40,0%	6	28,6%	16	17,6%
T2	13	44,8%	8	25,8%	4	40,0%	6	28,6%	31	34,1%
T3	9	31,0%	9	29,0%	2	20,0%	6	28,6%	26	28,6%
T4	5	17,2%	10	32,3%	0	0,0%	3	14,3%	18	19,8%
<b>Total</b>	29	100,0%	31	100,0%	10	100,0%	21	100,0%	91	100,0%

p-valor = 0,1529

O valor de  $p = 0,1529$ . Assim, não temos associação estatisticamente significativa entre as variáveis.

**Tabela 155. Relação das proteínas p53 e/ou p16 com a disseminação linfonodal**

Linfonodos	Grupo								Total	
	P53 (-) e p16 (-)		P53 (+) e p16 (-)		P53 (-) e p16 (+)		P53 (+) e p16 (+)			
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Positivos	22	75,9%	23	74,2%	7	70,0%	18	85,7%	70	76,9%
Negativos	7	24,1%	8	25,8%	3	30,0%	3	14,3%	21	23,1%
Total	29	100,0%	31	100,0%	10	100,0%	21	100,0%	91	100,0%
p-valor = 0,7061										

O p-valor foi de 0,7061. Assim, não temos associação estatisticamente significativa entre as variáveis.

**Tabela 156. Relação das proteínas p53 e/ou p16 com o linfonodo (N)**

Linfonodos	Grupo								Total	
	p53 (-) e p16 (-)		p53 (+) e p16 (-)		p53 (-) e p16 (+)		p53 (+) e p16 (+)			
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
N0	7	24,1%	8	25,8%	3	30,0%	3	14,3%	21	23,1%
N1	4	13,8%	5	16,1%	4	40,0%	4	19,0%	17	18,7%
N2a	3	10,3%	4	12,9%	1	10,0%	4	19,0%	12	13,2%
N2b	11	37,9%	7	22,6%	2	20,0%	3	14,3%	23	25,3%
N2c	3	10,3%	6	19,4%	0	0,0%	6	28,6%	15	16,5%
N3	1	3,4%	1	3,2%	0	0,0%	1	4,8%	3	3,3%
Total	29	100,0%	31	100,0%	10	100,0%	21	100,0%	91	100,0%

p-valor = 0.6567

O valor de  $p = 0,6567$ . Assim, não temos associação estatisticamente significativa entre as variáveis.

**Tabela 157. Relação das proteínas p53 e/ou p16 com a recidiva**

Recidiva	Grupo								Total	
	p53 (-) e p16 (-)		p53 (+) e p16 (-)		p53 (-) e p16 (+)		p53 (+) e p16 (+)			
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Não	5	17,2%	12	38,7%	6	60,0%	8	38,1%	31	34,1%
Sim	24	82,8%	19	61,3%	4	40,0%	13	61,9%	60	65,9%
Total	29	100,0%	31	100,0%	10	100,0%	21	100,0%	91	100,0%

p-valor = 0,0676

O valor de  $p = 0,0672$ . Assim, não temos associação estatisticamente significativa entre as variáveis (quase significativa). Pacientes com a proteína p53 negativa e p16 positiva mostraram menor número de recidivas.

**Tabela 158. Relação das proteínas p53 e/ou p16 com o óbito geral**

Óbito 3a	Grupo								Total	
	P53 (-) e p16 (-)		P53 (+) e p16 (-)		P53 (-) e p16 (+)		P53 (+) e p16 (+)			
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Não	10	34,5%	16	51,6%	7	70,0%	9	42,9%	42	46,2%
Sim	19	65,5%	15	48,4%	3	30,0%	12	57,1%	49	53,8%
Total	29	100,0%	31	100,0%	10	100,0%	21	100,0%	91	100,0%

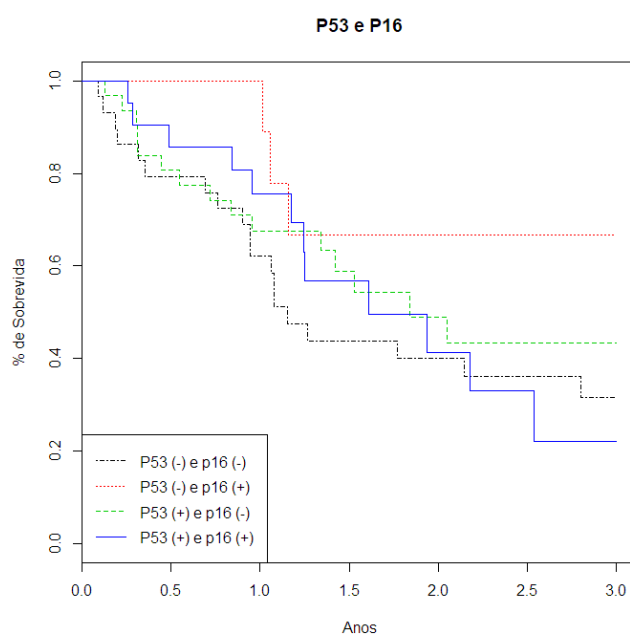
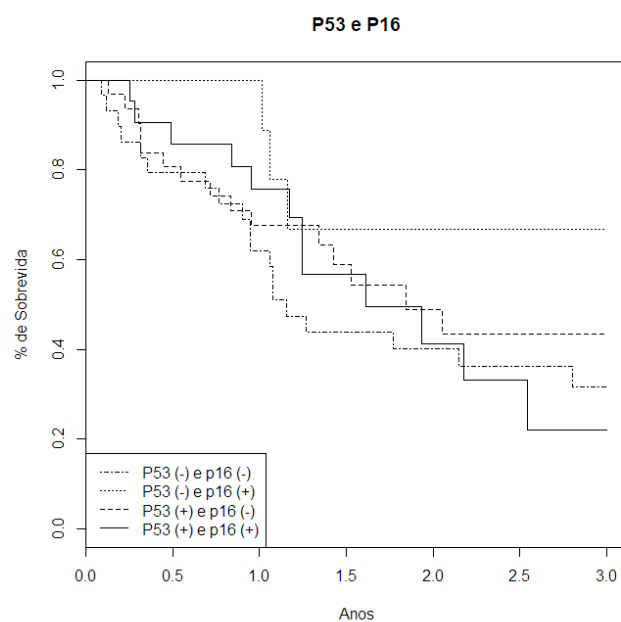
Observamos a maior frequência de óbitos nos 19 (65,5%) pacientes com as proteínas p53 e p16 negativas *versus* 3 (30%) pacientes com somente a proteína p16 positiva com a menor frequência de óbitos.

**Tabela 159. Relação das proteínas p53 e/ou p16 com o óbito pela doença**

Óbito pela doença 3ª	Grupo								Total	
	P53 (-) e p16 (-)		P53 (+) e p16 (-)		P53 (-) e p16 (+)		P53 (+) e p16 (+)			
	N	%	N	%	N	%	N	%	N	%
Não	13	44,8%	16	51,6%	7	70,0%	9	42,9%	45	49,5%
Sim	16	55,2%	15	48,4%	3	30,0%	12	57,1%	46	50,5%
Total	29	100,0%	31	100,0%	10	100,0%	21	100,0%	91	100,0%

Observamos as maiores frequências de óbitos pela doença nos 16 (55,2%) pacientes com a proteínas p53 e p16 negativas e 12 (57,1%) pacientes com a proteína p53 positiva e p16 positiva *versus* 3 (30%) pacientes com somente a proteína p16 positiva.

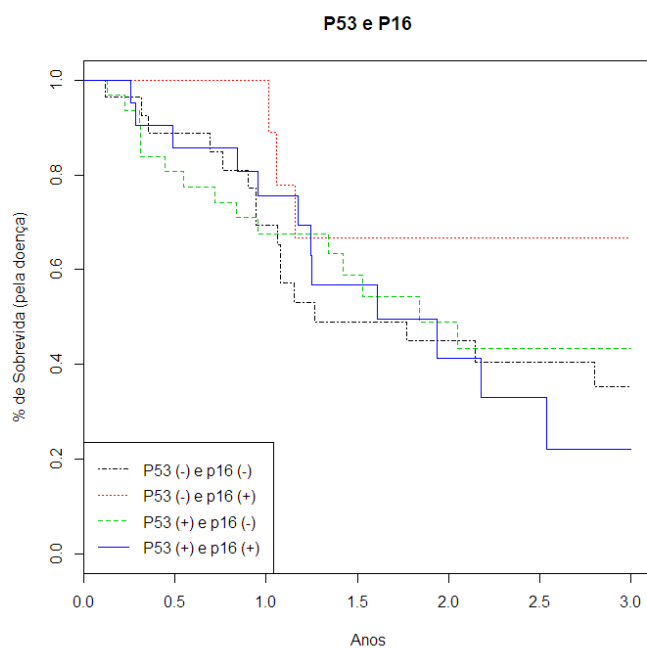
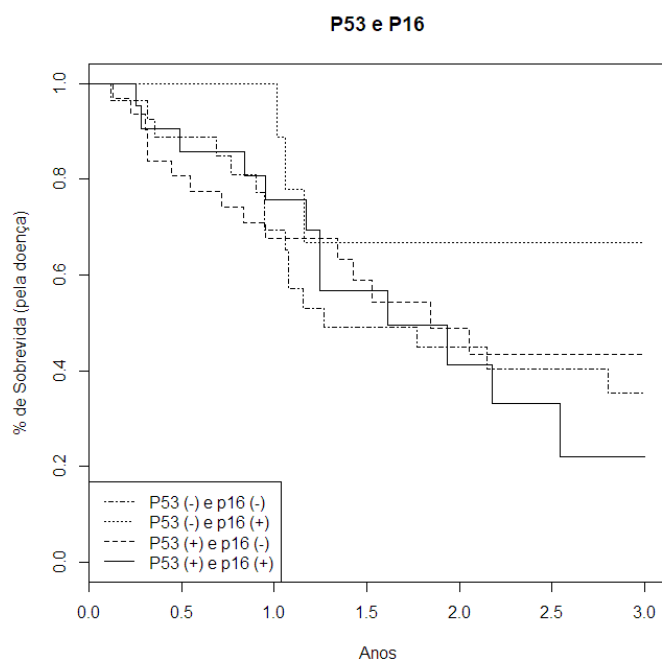
A seguir temos os gráficos com as curvas de sobrevivência para óbito geral, calculadas pelo estimador de Kaplan-Meier para cada categoria do p53 e p16 (Gráficos 63 e 64).



**Gráficos 63 e 64. Sobrevida dos pacientes com as proteínas p53 e/ou p16 – óbito geral**

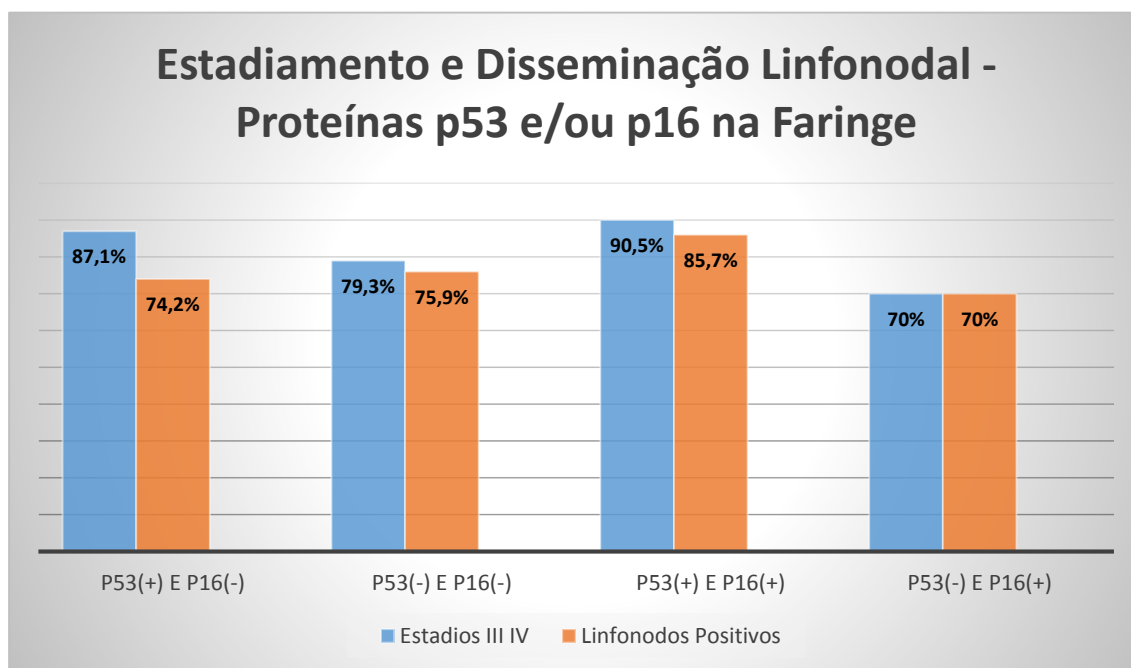
Temos que o valor de p para o teste de Log-rank foi de 0,3190. Assim, temos que não há diferença entre as curvas de sobrevida.

A seguir temos os Gráficos 65 e 66, com as curvas de sobrevivência para óbito pela doença, calculadas pelo estimador de Kaplan-Meier para cada categoria do p53 e p16.

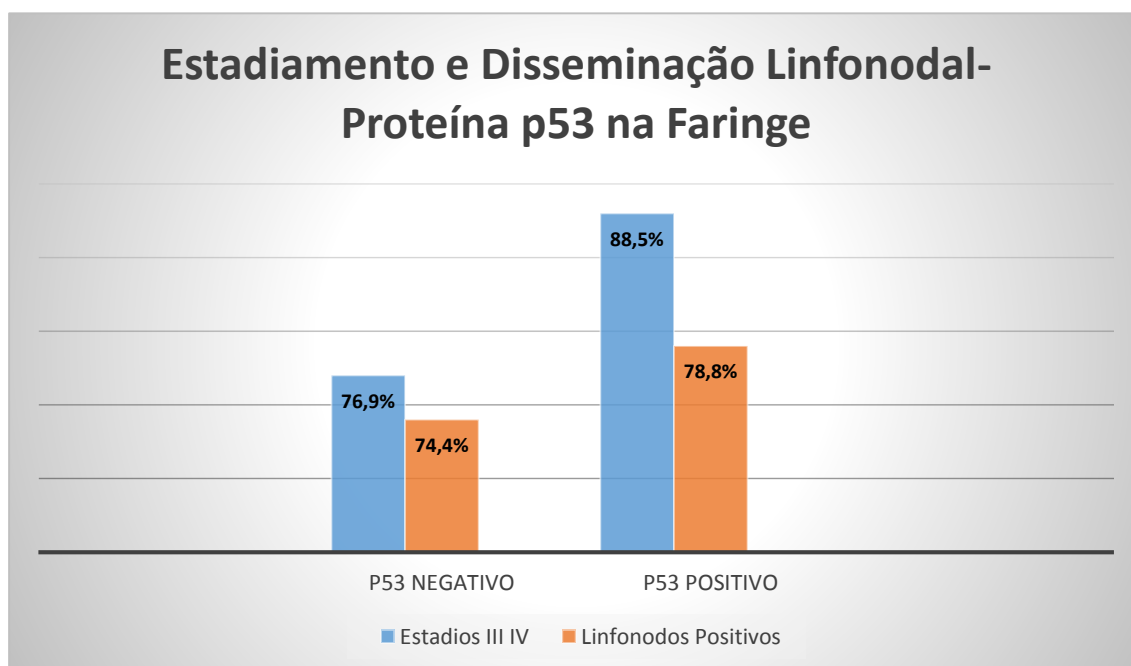


**Gráficos 65 e 66. Sobrevida dos pacientes com as proteínas p53 e/ou p16 – óbito pela doença**

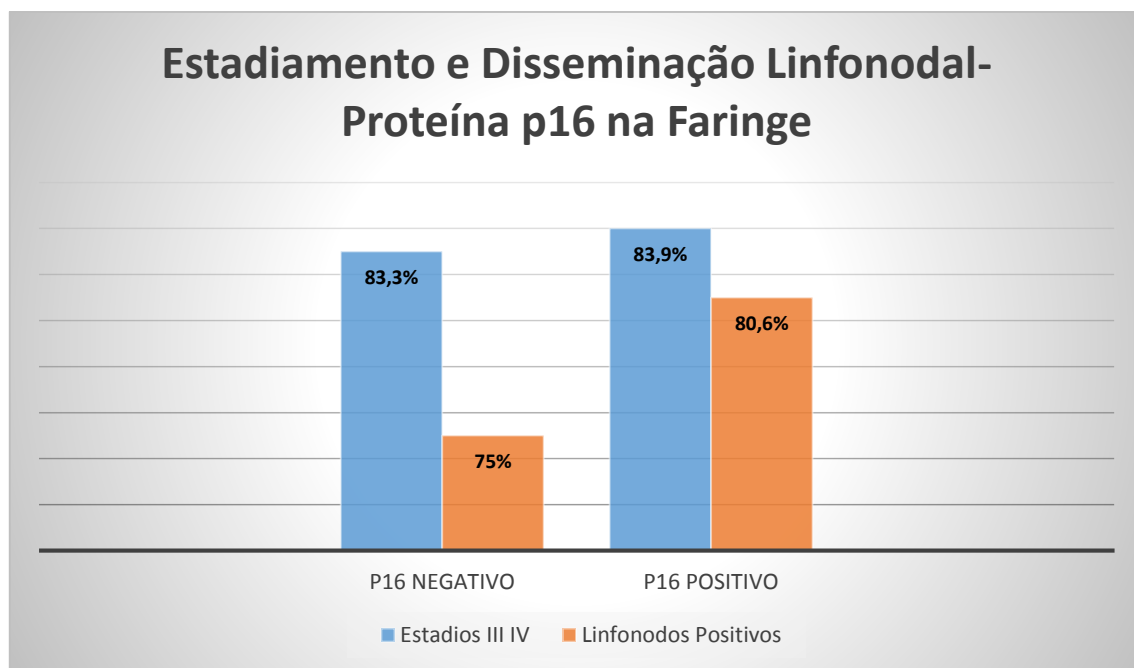
Temos que o valor de p para o teste de Log-rank foi de 0,4701. Assim, temos que não há diferença entre as curvas de sobrevida.



**Gráfico 67. Estadiamento e disseminação linfonodal da situação das proteínas p53 e p16 – Faringe**



**Gráfico 68. Estadiamento e disseminação linfonodal da situação da proteína p53 – Faringe**



**Gráfico 69. Estadiamento e disseminação linfonodal da situação da proteína p16 – Faringe**

## ***5. Discussão***

---



## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 Cavidade Oral

No primeiro grupo de pacientes com CEC na cavidade oral descrevemos aspectos epidemiológicos comuns a dados da literatura. Iniciaremos pelo gênero masculino, o mais frequente em 51 (73,9%) casos, com a idade média de 60,7 anos e a mediana de 60 anos para todos os pacientes. Em relação aos fatores de risco, o tabagismo ativo esteve presente em 41 (59,4%) pacientes e 16 (23,2%) pacientes eram ex-tabagistas. O etilismo foi registrado em 26 (37,7%) casos e 15 (21,7%) pacientes tinham história pregressa de dependência alcoólica (Goldenberg, Golz, 2003; Ruiz et al., 2006; Alvarenga et al., 2008; Chen et al., 2014; Perdomo et al., 2016; Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2018).

Na análise dos subsítios, a língua foi a mais acometida, em 31 (44,9%) casos e o carcinoma de células escamosas moderadamente diferenciados foi o mais frequente, com 34 (49,3%) pacientes, seguido por 27 (39,1%) casos com carcinoma de células escamosas bem diferenciados. A prevalência da língua e o grau moderado de diferenciação deve-se principalmente à contínua e maior exposição da mucosa lingual a agentes agressores locais, consequentes ao tabagismo, etilismo e/ou chimarrão. O conjunto desses fatores possui um amplo sinergismo nos mecanismos de danos aos DNAs celulares, predispondo condições para o desenvolvimento de neoplasias (Sul do Brasil) (Goldenberg e Golz, 2003; Alvarenga et al., 2008; Ferreira e Rocha, 2010; Chen et al., 2014; Perdomo et al., 2016).

A proteína p53 apresentou a sua maior frequência em 48 (69,6%) pacientes, enquanto obtivemos a frequência da proteína p16 em 21 (30,4%) casos. O resultado da proteína p53 é próximo ao de Zaid et al. (2018), que encontraram 74,3% de expressividade da proteína p53 nos fumantes de shisha. Porém, o valor ficou abaixo dos achados de Sathyamurthy et al. (2016), que encontraram 76% de positividade para a proteína p53, e superior à média de 60% de Karpathiou et al. (2016). Já o valor da proteína p16, de 30,4%, foi superior ao 20,8% encontrado por Karpathiou et al. (2016).

Na estratificação da proteína p 53, o nível C foi o mais encontrado, revelando altas concentrações da proteína p53 nos núcleos celulares, estando em 28 (40,6%)

casos, seguido por 21 (30,4%) casos da proteína p53 negativa. Os outros percentuais foram 15 (21,7%) casos da proteína p 53 nível B e 5 (7,2%) casos da proteína p53 nível A. Essas características refletem uma acentuada alteração nuclear, através do alto conteúdo proteico da proteína p53, o nível C, estabelecendo uma maior agressividade biológica do carcinoma de células escamosas na cavidade oral (Lane e Crawford, 1979; Levine, 1997; Fett-Conte e Sallae, 2002; Geisler et al., 2002; Colombo e Rahal, 2009; Ferreira e Rocha, 2010; Patel et al., 2018; Singla et al., 2018).

Com a proteína p16 observamos uma situação muito diferente em relação ao seu grau de expressividade. A nossa maior frequência foi a ausência da proteína p16 ou proteína p16 grau 0 em 48 (69,6%) casos, seguido por 12 (17,4%) casos da proteína p16 grau 1, 6 (8,7%) casos de proteína p16 grau 3 e 3 (4,3%) casos de proteína p16 grau 2. Esses resultados enfatizam a baixa frequência ou a ausência da proteína p16 nos carcinomas de células escamosas da cavidade oral, compatíveis com outros autores (Bova et al., 1999; Geisler et al., 2002; Yuen et al., 2002; Brito, Paula e Saddi, 2014).

É de consenso na literatura que a proteína p16 grau 3 está relacionada com o HPV-16, pois quando a expressividade da proteína é maior que 70% nos núcleos e nos citoplasmas celulares, considera-se o HPV-16 positivo (Smeets et al., 2007; Ang et al., 2010; Silva et al., 2012; Stephen et al., 2013). Nos demais graus da proteína p16 como o grau 2 não podemos relacionar ao HPV tipo 16 porque além da expressividade ser menor da proteína (marcador), há limitações nesse estudo por não ter a identificação do vírus pelo seu DNA. A expressividade da proteína 16 grau1 é menos relevante para o HPV -16, apesar da sua maior proporção. Os diferentes graus da expressividade da proteína p16 podem representar a sua função reguladora na proliferação e no ciclo celular. Essa situação parece sugerir uma “proteção”, mesmo com o baixo percentual do grau 3 da proteína p16, e os graus 1 e 2 não corresponderem ao HPV-16. Esses últimos podem ser produtos de interação de outros vírus de médio a alto risco através das oncoproteínas, em especial a E7 (Namazie et al., 2002; Worsham et al., 2006; Smeets et al., 2007; Psyrris e DiMaio, 2008; Brito, Paula e Saddi, 2014; Castellsagué et al., 2016).

No carcinoma de células escamosas da cavidade oral, a associação mais frequente foi de 33 (47,8%) casos das proteínas p53 positiva e p16 negativa. Nas demais associações o número de casos foi igual, tanto para as proteínas positivas como para as proteínas negativas, com 15 (21,7%) casos para cada associação. A

menor frequência foi 6 (8,7%) casos das proteínas p53 negativa e p16 positiva. Essas apresentações corroboram a importância da positividade da proteína p53 e ausência ou baixa prevalência da proteína p16 na carcinogênese da cavidade oral, no nosso meio (Bova et al., 1999; Geisler et al., 2002; Yuen et al., 2002; Ruiz et al., 2006; Colombo e Rahal, 2009; Sathiyamurthy et al., 2016).

A idade média dos nossos pacientes com a proteína p53 e p16 foi de 61,6 e 62,1 respectivamente, correspondendo à idade média geral dos pacientes com carcinoma de células escamosas. Não houve diferenças significativas em relação à idade na presença das proteínas (Ruiz et al., 2006; Alvarenga et al., 2008; Colombo e Rahal, 2009; Perdomo et al., 2016).

#### 5.1.1 Proteína p53

A proteína p53 prevaleceu no gênero masculino em 36 (75%) casos, conforme o esperado, por ser uma neoplasia mais frequente nos homens. No gênero feminino teve o dobro de expressividade com 12 (25%) casos, demonstrando a importância do tabagismo entre as mulheres, apesar do menor número de CEC entre as mesmas (Goldenberg, Golz e Joachims, 2003; Alvarenga et al., 2008; Perdomo et al., 2016).

Como já descrito anteriormente, a proteína p53 teve a maior expressão na língua de forma isolada. Porém, na análise conjunta do soalho oral e a língua, a ausência da proteína foi quase significativa. A explicação pode ser pelo maior contato dos fatores de risco como o tabaco, a bebida alcoólica e o chimarrão com a mucosa lingual. Logo, a língua passa a ser o primeiro local exposto às agressões no seu epitélio de revestimento. Ao compararmos a língua e/ou soalho oral com os demais subsítios, verificamos uma maior evidência da proteína p53 nos primeiros. A proteína p53 estava presente em 30 (62,5%) pacientes com a língua e/ou soalho oral comprometidos e ausente nos outros 15 (71,4%) casos, sem significância estatística ( $p = 0,586$ )

A cirurgia foi o nosso tratamento padrão, com ou sem adjuvância, em 43 (89,6%) pacientes com a proteína p53 positiva, sem relevância estatística com os 20 (95,2%) pacientes com a proteína p53 negativa ( $p = 0,659$ ).

Observamos um maior número de carcinoma de células escamosas em estádios III e IV com a proteína p53 positiva, sem significado estatístico ( $p = 0,432$ ). Entretanto, constatamos uma discreta prevalência da proteína nos tumores T1, 15

(31,3%) casos; T2 ,17 (35,4%) casos; até tumores mais avançados, como o T4, em 5 (10,4%) casos. Ou seja, a proteína p53 está presente desde as primeiras lesões até os tumores mais avançados. Esse fato corrobora o seu papel no controle do ciclo celular e na preservação do genoma.

São várias as etapas a se desenvolver até o estabelecimento de lesões neoplásicas invasivas. Na constância e progressão dos danos às células, o gene P53 pode perder a sua ação supressora e transformar-se em um oncogene, reproduzindo essas mutações à proteína p53, com aumento da sua expressividade. Dessa forma, estabelece-se um potencial de neoplasia mais agressiva, infiltrativa, com apresentações mais avançadas. A proteína p53 é essencial para o equilíbrio gênico, além da possibilidade da mesma ser o produto das mutações transcritas do gene P53, presente em muitas neoplasias de cabeça e pescoço, tumores de outras regiões ou de outra natureza (Lane e Crawford, 1979; Fett-Conte e Sallae, 2002; Ruiz et al.,2006; Binato, 2007; Bloching et al., 2008; Colombo e Rahal, 2009; Galli et al., 2009; Mondal et al., 2013; Luken, Conde e Carnero, 2016; Patel et al., 2018; Singla et al., 2018; Zaid et al., 2018).

Na disseminação linfonodal não houve diferença estatística entre linfonodos positivos e negativos na presença da proteína p53 ( $p = 0,308$ ). Houve um maior número de linfonodos N1, 11(22,9%) casos, e N2b, 10 (20,8%) casos, com a proteína p53, sem significado estatístico ( $p = 0,318$ ). Esses resultados indicam um maior comprometimento da proteína no sítio primário da neoplasia do que nos linfonodos; diferente da publicação de Pruneri, Pignataro e Carboni (1998), que mostraram mais metástases linfonodais na associação do p53/bcl-2 no carcinoma de laringe (Pruneri, Pignataro e Carboni, 1998).

Na análise da recidiva, foram 28 (40,6%) casos que recidivaram, 19 (39,6%) com a proteína p53 e 9 (42,9%) na ausência da proteína p53, sem significado estatístico ( $p = 0,797$ ). O índice de recidiva de quase 40% com a proteína p53 sugere uma provável ação oncogênica dependente do processo instalado nos códons. As mutações mais comuns nos exóns 5-8 ou 5-9 podem acelerar a função de um oncogene, ocasionando uma evolução desfavorável com recidivas, além de um resultado negativo ao tratamento (Gao e Zelenka, 1997; Levine, 1997; Pruneri, Pignataro e Carboni, 1998; Weinert, 1998; Geisler et al., 2002; Fett-Conte e Sallae, 2002; Ruiz et al.,2006; Colombo e Rahal, 2009; Ferreira e Rocha, 2010; Patel et al., 2018).

No estudo da sobrevida, fizemos a análise com a taxa de óbitos geral e pela doença. Em relação ao óbito geral, registramos 19 (39,6%) pacientes com a proteína p53 e 4 (19%) pacientes com a proteína p53 negativa. O teste de Log-rank teve o valor de  $p = 0,066$  (quase significativo), não havendo diferença nas curvas de sobrevida entre a proteína p53 positiva e a proteína p53 negativa. Entretanto, houve um maior declínio da sobrevida dos pacientes com a proteína p53 positiva comparativamente à sobrevida dos pacientes com a proteína p53 negativa. No teste de Cox univariado observamos 2,6 vezes mais chances de óbitos geral com pacientes com a proteína p53 positiva comparados aos pacientes com a proteína p53 negativa ( $p = 0,077$ , não significativo). No Cox ajustado pelo sexo e a idade, observamos que os pacientes com a proteína p53 positiva tem 2,4 chances de evoluir para o óbito geral, comparados aos pacientes com a proteína p53 negativa ( $p = 0,1198$ , não significativo).

Em relação ao óbito pela doença, computamos 17 (35,4%) casos com a proteína p53 positiva, e 3 (14,3%) casos com a proteína p53 negativa. O teste de Log-rank mostrou o valor de  $p = 0,052$  (quase significativo), sem diferença entre as curvas. Entretanto, houve um maior declínio na curva de sobrevida dos pacientes com a proteína p53 positiva. O teste de Cox univariado mostrou que os pacientes com a proteína p53 positiva tem 3,2 vezes mais chances de evolução para óbito pela doença do que os pacientes com a proteína p53 negativa ( $p = 0,066$ , quase significativo). No Cox ajustado pelo sexo e idade, mostra 2,8 chances para óbito pela doença nos pacientes com a proteína p53 positiva ( $p = 0,105$ , não significativo). O “perfil quase significativo” com a proteína p53 positiva no óbito pela doença sugere um “aspecto de risco na carcinogênese” da cavidade oral, tão bem exposto por outros autores (Levine, 1997; Fett-Conte e Sallae, 2002; Geisler et al., 2002; Bloching et al., 2008; Galli et al., 2009; Ferreira e Rocha, 2010; Almangush et al., 2017; Patel et al., 2018; Singla et al., 2018; Zaid et al., 2018).

Na avaliação do nível da proteína p53 com o óbito geral observamos 4 (80%) casos de proteína p53 nível A, 6 (40%) casos da proteína p53 nível B, 9 (32,1%) casos da proteína p53 nível C e 4 (19%) casos da proteína p53 negativa que evoluíram para óbito geral. O teste de Log-rank = 0,0031 mostrou diferença entre as curvas, sendo que a melhor sobrevida ficou com os pacientes com a proteína p53 negativa ou ausência da proteína p53. Na análise do nível da proteína p53 com o óbito pela doença observamos 4 (80%) casos de proteína p53 nível A, 6 (40%) casos de proteína p53 nível B, 7 (25%) casos de proteína p53 nível C e 3 (14,3%) casos de proteína p53

negativo que evoluíram para óbito pela doença. O teste de Log-rank foi de 0,0006. Assim, houve diferença entre as curvas, onde a melhor sobrevida ficou com os pacientes com a proteína p53 negativa, repetindo as mesmas características da análise dos óbitos em geral.

Ao relacionarmos o nível de expressividade da proteína p53 com o grau de expressividade da proteína p16 simultaneamente, verificamos a possível interferência de uma proteína sobre a outra, no percentual de óbitos geral ou pela doença. Assim, registramos:

Nos 28 pacientes com proteína p53 positiva nível C, havia 13 (46,4%) pacientes com as proteínas p16 positiva entre os graus 1, 2 e 3, e 15 (53,6%) pacientes com a proteína p16 grau 0. Total de 46,4% de proteína p16 positiva.

Nos 15 pacientes com proteína p53 positiva nível B havia 1 (6,7%) paciente proteína p 16 positiva grau 1 e 14 (93,3%) pacientes com a proteína p 16 grau 0. Total de 6,7% de proteína p16 positiva.

Nos 5 pacientes proteína p53 positiva nível A havia apenas 1 (20%) paciente proteína p16 positiva grau 1 e 4 (80%) casos de pacientes proteína p16 grau 0. Total de 20% de proteína p16.

Nos 21 pacientes com proteína p53 negativa havia 3 (14,3%) pacientes com a proteína p16 positiva grau 1, 0 (0,0%) paciente com a proteína p16 grau 2 e 3 (14,3%) pacientes com a proteína p16 grau 3 e 15 (71,4%) pacientes com a proteína p16 grau 0. Total de 28,6% de proteína p16.

Na relação cruzada entre as proteínas p53 e p16, a média da proteína p16 foi 25,4%, sendo a maioria constituída pela proteína p16 grau 1.

Na concomitância das proteínas p53 e p16 verificamos a maior proporção da proteína p16 junto à proteína p53 no nível C, e a menor proporção nos níveis A e B. As maiores proporções da proteína p16 com o nível mais alto de expressão da proteína p53 podem ter minimizado o risco de óbitos da mesma forma que a menor frequência da proteína p16 nos níveis B e, principalmente, no nível A da proteína p53, contribuíram para um maior número de óbitos. Outro fato relevante é o sequenciamento genético das proteínas p53 e p16, que pode justificar a potencialidade supressora ou oncogênica das mesmas. Não foi realizado esse sequenciamento genético, o que configura uma limitação do nosso estudo.

Também chama-se a atenção para o menor número de óbitos com a ausência da proteína p53 e o nível C da proteína p53, o que nos permite sugerir a influência

supressora tumoral da proteína p16, inibindo a fase G1/S no ciclo celular. Além disso, a maior expressão da proteína p53 parece inferir um sequenciamento menos mutagênico, com maior controle de danos sobre o DNA e/ou a apoptose celular. Nos níveis A e B de expressividade da proteína p53 o número de óbitos contribuiu muito para a queda da sobrevida dos pacientes com a proteína p53, apesar de sua menor expressão. Atribuímos esses resultados principalmente para a menor proporção de proteína p16 existente nesses pacientes. E, quando presente, a proteína p16 provavelmente tenha sofrido desregulação por interferência contínua de agentes de risco como o tabagismo, etilismo e o chimarrão, bloqueando a sua função regulatória de proliferação celular. Pela mesma ação desses agentes, os danos podem ter sido ampliados nos códons do genes P53. E, por consequência, contribuir com mutações em exons importantes como 5-8 e 5-9, reproduzindo essas alterações na proteína p53.

Com a associação desses mecanismos entre as proteínas p53 e p16, o número de óbitos foi maior na menor expressividade das proteínas p53, particularmente o nível A. Todas essas alterações envolvendo as proteínas p53 e p16 têm sido identificadas em neoplasias mais agressivas, com pior evolução, resistência à radioterapia, recidivas precoces e maior número de óbitos, por autores como Bova et al. (1999), Fett- Conte, Salles (2002), Geisler et al. (2002), Yuen et al. (2002), Ferreira e Rocha (2010), Perri et al. (2015), Rasmussen et al.(2017) e Patel et al. (2018). Esses resultados no carcinoma de células escamosas da cavidade oral sugerem um conceito mais dinâmico da expressividade das proteínas p53 e p16 tanto para “risco ou proteção” no desenvolvimento da doença (Geisler et al., 2002; Wang et al., 2012, Britto. Paula e Saddi, 2014; Sathyamurthy et al., 2016; Rasmussen et al., 2017; Patel et al., 2018).

### 5.1.2 Proteína p16

A proteína p16 foi identificada em 21 (30,4%) casos e menos expressa em relação ao gênero ( $p = 1,0000$ ). Ela estava mais evidente no gênero masculino, em 16 (76,2%) casos, sem significância estatística.

Na avaliação dos subsítios foram identificados 8 (16,7%) casos de pacientes com a proteína p16 negativa no soalho e língua, e apenas 1 (4,8%) caso de paciente com a proteína p16 positiva, com significado estatístico ( $p = 0,001$ ). Ou seja, ao compararmos a expressividade da proteína p16 na língua e/ou soalho oral com os

demais subsítios também houve a confirmação da significância estatística com 9 (42,9%) casos da proteína p16 positiva e 36 (75%) casos da proteína p16 negativa ( $p = 0,014$ ). A língua e/ou soalho oral são os subsítios de menor expressividade da proteína p16. Por outro lado, identificamos uma maior frequência da proteína p16 positiva na área retro molar, com 9 (42,9%) casos, se comparados a 3 (6,3%) casos de pacientes com a proteína p16 negativa. Esses achados demonstram que as localizações proximais à orofaringe, como a área retro molar, têm um maior percentual da proteína p16, compatíveis com os resultados de Castellsagué et al. (2016), quando se refere à relação HPV-16/proteína p16 positiva à subsítios proximais à orofaringe (Castellsagué et al., 2016). Assim como a proteína p53, a expressividade da proteína p16 não mostrou nenhuma relevância no tratamento, pois a maioria dos pacientes tiveram a cirurgia como base no tratamento ( $p = 0,659$ ).

No estadiamento não houve nenhuma diferença entre os estádios iniciais e avançados em relação à proteína p16. Entre os pacientes com a proteína p16 positiva houve um leve percentual de estádios III e IV, sem relevância estatística ( $p = 0,611$ ) (Ruiz et al., 2006; Colombo e Rahal, 2009). A maior frequência da proteína p16 positiva foi entre os tumores T1 e T2 (Karpithiou et al., 2016). Para os tumores T4, a frequência foi de 5 (10,4%) pacientes com proteína p16 negativa e 3 (14,3%) pacientes com proteína p16 positiva, sem relevância estatística ( $p = 0,557$ ) (Ruiz et al., 2006; Colombo e Rahal, 2009; Karpithiou et al., 2016).

A maior disseminação linfonodal desenvolveu-se nos pacientes com a proteína p16 negativa, porém sem significado estatístico ( $p = 0,432$ ). A maior prevalência de linfonodos positivos foi nos pacientes com a proteína p16 negativa, onde encontramos 4 (8,3%) pacientes com a proteína p16 negativa com linfonodos N2c e nenhum paciente com a proteína p16 positiva com linfonodo N2c ( $p = 0,239$ ). A proliferação celular local e doença disseminada nos linfonodos de pacientes com a proteína p16 negativa na cavidade oral corroboram com outros autores Syrjanen et al. (1983), Bova et al. (1999), Geisler et al. (2002), Namazie et al. (2002), Yuen et al. (2002), Abrahão et al. (2011), Laco et al. (2012), Brito, Paula e Saddi (2014) e Perri et al. (2015).

Em relação à recidiva encontramos o menor número de recidivas com 5 (23,8%) casos de pacientes com a proteína p16 positiva, comparados aos 23 (47,9%) pacientes com a proteína p16 negativa, cujo o valor de  $p = 0,069$ , quase significativo, aproximando a proteína p16 ao caráter de proteção, na gênese neoplásica da



cavidade oral (Syrjanen et al., 1983; Bova et al., 1999; Yuen et al., 2002; Brito, Paula e Saddi, 2014; Laco et al., 2012).

Na análise da sobrevida fizemos o estudo pela taxa de óbitos geral e óbitos pela doença. A taxa de óbitos geral para os pacientes com a proteína p16 positiva foi de 6 (28,6%) casos, e para os pacientes com a proteína p16 negativa foi de 17 (35,4%) casos. O teste de Log-rank = 0,623, sem diferenças nas curvas de sobrevida. No Cox univariado observamos 0,8 chances para óbito geral com os pacientes com a proteína p16 positiva, com o valor de  $p = 0,624$ , sem significado estatístico. No Cox ajustado pelo sexo e idade, temos 0,7 chances para óbito geral com os pacientes com a proteína p16 positiva, com o valor de  $p = 0,411$ , também sem importância estatística.

Para o óbito pela doença observamos a taxa de 5 (23,8%) casos para os pacientes com a proteína p16 positiva e 15 (31,3%) casos para os pacientes com a proteína p16 negativa. O teste de Log-rank = 0,578, sem diferença nas curvas de sobrevida. No Cox univariado observamos 0,7 chances de evolução para óbito pela doença nos pacientes com a proteína p16 positiva, com o valor de  $p = 0,579$ , sem valor estatístico. No Cox ajustado pelo sexo e idade temos 0,6 chances de evoluir para óbitos pela doença, cujo valor de  $p = 0,370$  (sem significado).

No grau de expressividade da proteína p16 o número de óbitos foi maior quanto menor a expressão da proteína 16, ou a ausência da mesma. Nos óbitos gerais encontramos 6 (50%) pacientes com a proteína p16 grau 1 e 17 (35,4%) pacientes com a proteína p16 grau 0. Nenhum caso de óbito geral com os pacientes com as proteínas p16 grau 2 e grau 3. Teste de Log-rank = 0,085. Na taxa de óbitos pela doença houve 5 (41,7%) pacientes com a proteína p16 grau 1 e 15 (31,3%) pacientes com a proteína p16 grau 0, com evolução para o óbito pela doença. Nenhum caso de óbito pela doença nos pacientes com as proteínas p16 grau 2 e grau 3. Teste de Log-rank = 0,148. Essas características mostram o potencial favorável com a presença da proteína p16 no carcinoma de células escamosas da cavidade oral. Esses pacientes possuem como características clínicas uma doença menos avançada com tumores T1 e T2, menor comprometimento linfonodal, menos recidivas e menor taxa de óbitos. Todos esses aspectos confirmam a função supressora tumoral e moduladora na proliferação celular da proteína p16, favorecendo a evolução desses pacientes (Syrjanen et al., 1983; Bova et al., 1999; Namazie et al., 2002; Yuen et al., 2002; Fakhry et al., 2008; Laco et al., 2012; Brito, Paula e Saddi, 2014; Deng et al., 2014; Castellsagué et al., 2016; Karpathiou et al., 2016).

No estudo das quatro situações das proteínas observamos uma maior prevalência do CEC na língua e/ou soalho oral com ambas proteínas negativas, sendo significativamente estatístico, podendo corresponder a estádios iniciais e às formas menos agressivas da doença, não caracterizando necessariamente a mesma intensidade de exposição de fatores de risco ( $p = 0,043$ ). Nessa situação talvez o interessante seria abordar outros marcadores na gênese desses tumores com ambas as proteínas p53 e p16 negativas. No entanto, houve um maior número de casos em estádios III, IV com a proteína p53 positiva e a proteína p16 negativa em 18 (54,5%) casos, seguidos por ambas as proteínas positivas com 9 (60%) casos, 3 (50%) casos de proteínas p53 negativa e p16 positiva, e o menor estadiamento foi encontrado em 6 (40%) casos de ambas proteínas negativas, sem valor estatístico ( $p = 0,754$ ).

De forma semelhante ocorreu no tamanho do tumor (T), onde houve uma discreta prevalência de T1 e T2 entre as quatro situações das proteínas, porém sem relevância estatística ( $p = 0,588$ ).

Sob o aspecto da disseminação linfonodal observamos a menor proporção percentual de linfonodos positivos em 5 (33,3%) casos com as proteínas p53 e p16 negativas, e a maior proporção percentual de linfonodos positivos em 9 (60%) casos com as proteínas p53 positiva e p16 positiva. Maior número de linfonodos positivos aconteceu com 16 (48,5%) pacientes com somente a proteína p53 positiva, porém sem significado estatístico ( $p = 0,553$ ). Houve uma proporção maior de N1 e N2b com os pacientes com a proteína p53 positiva e p16 negativa, seguido por ambas as proteínas positivas, sem repercussão estatística ( $p = 0,266$ ).

Na análise da recidiva houve um menor número de casos com a situação da proteína p53 negativa e p16 positiva, com 2 (33,3%) casos, e o maior número de recidivas com 16 (48,5%) casos da proteína p53 positiva e p16 negativa. Observamos um maior número de recidivas quando há a presença da proteína p53, porém sem valor estatístico ( $p = 0,273$ ).

Na sobrevida houve um maior número de óbitos geral com os pacientes com a proteína p53 positiva e proteína p16 negativa, numa proporção de 14 (42,4%) casos, e a menor proporção foi 1 (16,7%) paciente com somente a proteína p16 positiva. Ao observarmos a curva de sobrevida para o óbito geral das quatro situações das proteínas não há diferença entre as mesmas, com o teste de Log-rank= 0,284. Porém, a melhor curva de sobrevida mostrou uma tendência para os pacientes com a proteína

p16 positiva e p53 negativa, e o pior declínio da curva ficou nos pacientes com a proteína p53 positiva e a proteína p16 negativa.

Em relação ao óbito pela doença destacamos a maior proporção de óbitos para 13 (39,4%) pacientes com a proteína p53 positiva e p16 negativa, e apenas 1 (16,7%) óbito para o paciente com somente a proteína p16 positiva. Aqui também se repetiu a situação anterior. Não houve diferença entre as curvas de sobrevida com o teste de Log-rank = 0,211. A melhor sobrevida mostrou uma tendência para os pacientes com a proteína p53 negativa e a proteína p16 positiva, e a pior para os pacientes com a proteína p53 positiva e a proteína p16 negativa.

Com esses resultados podemos caracterizar que o aumento da expressividade da proteína p53 pode representar mutações nos principais éxons do gene P53, sugerindo, dessa forma, um perfil de risco na evolução da doença. Conforme Patel et al. (2018), a função do P53 destaca-se como mediador de resposta celular aos vários danos sobre o DNA, com diferentes respostas ao tratamento. Essas modificações são reproduzidas para a sua proteína p53, interferindo na apoptose e na regulação do ciclo celular (Levine, 1997; Fett-Conte e Salles, 2002; Geisler et al., 2002; Ruiz et al., 2006; Binato, 2007; Bloching et al., 2008; Colombo e Rahal, 2009; Galli et al., 2009; Ferreira e Rocha, 2010; Tandon et al., 2010; Wang et al., 2012; Almangush et al., 2017; Patel et al., 2018; Singla et al., 2018; Zaid et al., 2018), enquanto a proteína p16 parece ter mais um papel de proteção. A sua função está diretamente relacionada à proliferação celular, participando também da regulação do ciclo celular. A presença de mutações no códon da proteína ou mesmo a sua ausência reproduzem diferentes níveis de expressividade, podendo corresponder a uma doença mais avançada (Bova et al., 1999; Namazie et al., 2002; Yuen et al., 2002; Fakhry et al., 2008; Abrahão et al., 2011; Laco et al., 2012; Wang et al., 2012; Stephen et al., 2013; Brito, Paula e Saddi, 2014; Deng et al., 2014; Perri et al., 2015; Castellsagué et al., 2016; Ottria et al., 2018).

Ressaltamos os estudos de Bova et al. (1999) e Yuen et al. (2002), que destacam a baixa frequência e/ou o menor grau de expressão da proteína p16. Essa baixa expressividade da proteína p16 pode caracterizar um prognóstico mais reservado para o carcinoma de células escamosas na cavidade oral (Bova et al., 1999; Yuen et al., 2002). Porém, quando a proteína p16 está presente, sensibiliza uma melhor resposta à radioterapia e/ou quimioterapia, propiciando menor número de recidivas e melhor sobrevida. Vários aspectos apresentados dos nossos pacientes mostraram compatibilidade com outros autores (Namazie et al., 2002; Begun et al.,

2003; Kremer et al., 2005; Worsham et al., 2006; Smeets et al., 2007; Psyrri, DiMaio, 2008; Isayeva, Yufeng e Maswahu, 2012; Laco et al., 2012; Stephen et al., 2013; Brito, Paula e Saddi, 2014; Deng et al., 2014; Fakhry et al., 2017).

## 5.2 Laringe

O mesmo perfil de paciente com carcinoma epidermóide na cavidade oral se reproduziu no paciente com CEC na laringe. Na nossa casuística de 79 pacientes, a idade média e mediana foram de 63,6 e 63 anos, respectivamente. 72 (91,1%) pacientes pertenciam ao gênero masculino. Em relação aos fatores de risco registramos 44 (55,7%) pacientes tabagistas ativos e 31 (39,2%) pacientes ex-tabagistas, 33 (41,8%) pacientes com consumo importante e rotineiro de bebidas alcoólicas e 28 (35,4%) pacientes com história pregressa de etilismo (Goldenberg, Golz e Joachims, 2003; Alvarenga et al., 2008; Chen et al., 2014; Perdomo et al., 2016; Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2018).

A localização mais frequente da neoplasia foi na região glótica, em 44 (55,7%) pacientes, seguido por 20 (25,3%) casos na região supra glótica. A maioria dos pacientes possuía carcinoma de células escamosas moderadamente diferenciados, estando presentes em 39 (49,4%) casos, seguido por 29 (36,7%) pacientes com carcinoma de células escamosas bem diferenciados, compatíveis com outros autores (Pruneri, Pignataro e Carboni, 1998; Luken, Conde e Carneiro, 2016; Perdomo et al., 2016).

No carcinoma de células escamosas na laringe observamos 45 (57%) pacientes com a proteína p53 positiva e 23 (29,1%) pacientes com a proteína p16 positiva. Nossa expressividade da proteína p53 está equivalente com os resultados de Sarafoleanu et al. (2009), e inferior aos resultados de Pruneri et al. (1998) e Sathyamurthy et al., (2016), mas próximo aos resultados de Mondal et al. (2013). Já a proteína p16 mostrou-se um pouco mais expressa em relação a outras estatísticas; porém não corresponde necessariamente ao HPV tipo 16. Não houve a identificação do vírus, conferindo ser uma limitação da nossa pesquisa (Geisler et al., 2002; Yuen et al., 2002; Hernandez et al., 2016; Karpathiou et al., 2016).

Na estratificação das proteínas p53 e p16 temos 34 (43%) casos de proteína p53 negativa como a situação mais frequente. A proteína p53 positiva nível C é a segunda, com 30 (38%) casos, seguida pelas proteínas p53 positiva nível B, com 8

(10,1%) casos, e a proteína p53 positiva nível A, com 7 (8,9%) casos. No grau de expressividade da proteína p16 os pacientes com proteína p16 grau 0 ou negativa foram os mais frequentes, com 56 (70,9%) casos, seguidos por 17 (21,5%) pacientes com proteína p16 grau 1, 4 (5,1%) casos com proteína p16 grau 2 e apenas 2 (2,5%) casos com proteína p16 grau 3.

A maior expressividade da proteína p53 no carcinoma espinocelular da laringe está principalmente relacionado aos efeitos do tabagismo na mucosa respiratória. A proteína p53 encontra-se presente desde o início dos processos oxidativos, como nos estados inflamatórios, e a sua ação vai se acentuando à medida que vai ocorrendo as transformações moleculares. Essas mudanças são decorrentes da agressão constante das substâncias químicas tóxicas voláteis (92%) e de elementos particulados (8%) presentes na fumaça do tabaco. O etilismo soma um efeito sinérgico amplificador sobre essas alterações epiteliais, especialmente na mucosa da região supra glótica. O aumento da expressividade vai se intensificando à medida que as lesões evoluem de estado pré-invasivo a invasivo, com graus de variados de diferenciação celular (Nadal et al., 1995; Spafford et al., 1996; Jin et al., 1998; Pruner, Pignataro e Carboni, 1998; Jackel et al., 2000; Kumar et al., 2008; Rodrigues et al., 2008; Sarafoleanu et al., 2009; Mondal et al., 2013; Simsek et al., 2014; Yang et al., 2014; Luken, Conde e Carneiro, 2016).

Já o grau de expressividade da proteína p16 no nosso estudo é menos expresso em concordância com outros autores (Yuen et al., 2002; Silva et al., 2012; Castelisagué et al., 2016; Hernandez et al, 2016). No trabalho ficou bem evidente a menor expressividade da proteína p16, em especial o grau 3, onde documentamos apenas dois casos. O grau 3 da proteína p16 identifica o marcador em mais de 70% dos núcleos e citoplasmas celulares, correspondendo ao HPV-16. A laringe é o local de menor expressividade da proteína p16. Essa baixa frequência parece confirmar a pouca relevância do HPV-16 na gênese do carcinoma de células escamosas na laringe (Yuen et al., 2002; Silva et al., 2012; Castelisagué et al., 2016; Hernandez et al, 2016).

Semelhante à cavidade oral, a proteína p53 positiva e a proteína p16 negativa foi a situação prevalente com 31 (39,2%) pacientes. A segunda foi a ausência das proteínas em 25 (31,6%) casos, seguido por 14 (17,7%) pacientes com as proteínas p53 e p16 positivas, e apenas 9 (11,4%) pacientes com somente a proteína p16 positiva. Na associação entre as proteínas verificamos a preponderância da proteína

p53 e a pouca relevância da proteína p16 no carcinoma de células escamosas da laringe (Spafford et al., 1996; Pruner, Pignataro e Carboni, 1998; Jackel et al., 2000; Smith et al., 2010; Mondal et al., 2013; Simsek et al., 2014; Hernandez et al., 2016; Karpathiou et al., 2016).

Houve uma equivalência na idade média dos pacientes do grupo anterior com os pacientes com CEC na laringe: 64 anos para os pacientes com a proteína p53 positiva e 63,3 anos para os pacientes com a proteína p16 positiva, sem diferença estatística. Isto é, não há correspondência entre a idade e as proteínas p53 e p16 (Ruiz et al., 2006; Colombo, Rahal, 2009; Karpathiou et al., 2016).

### 5.2.1 Proteína p53

Na laringe, a expressão da proteína p53 foi bem maior no gênero masculino, porém sem significado estatístico ( $p = 0,133$ ). A proteína p53 foi mais identificada na glote em 26 (57,8%) casos. Quando a neoplasia ultrapassou o ventrículo de Morgagni (transglótico) houve leve expressividade da proteína p53 em 9 (20%) casos, sem significado estatístico ( $p = 0,820$ ). A maior presença da proteína p53 na glote pode ser resultado das transformações moleculares ocorridas no epitélio laríngeo, por consequência dos efeitos contínuos do tabagismo, mencionados anteriormente (Nadal et al., 1995; Mondal et al., 2013). O tratamento de base foi a cirurgia, sem relevância estatística com a expressividade positiva da proteína p53 ( $p = 1,000$ ).

Em relação ao estadiamento, houve uma maior expressividade da proteína p53 desde as lesões iniciais até o estágio mais avançado, com predomínio nos tumores T4, com 15 (33,3%) casos, sem representação estatística ( $p = 0,294$ ) (Simsek et al., 2014).

Na disseminação linfonodal houve uma maior frequência de linfonodos negativos, justificada pelo maior número de tumores glóticos, onde a drenagem linfática é muito rara. Novamente a expressividade da proteína p53 não inferiu importância estatística, porém os pacientes com a proteína p53 positiva apresentaram menor número de metástases linfonodais ( $p = 0,139$ ). No aspecto local do linfonodo (N) o maior comprometimento foi observado nos pacientes com a proteína p53 negativa, sem significado estatístico ( $p = 0,193$ ). Esses achados sugerem a expressão funcional da proteína p53 no sítio primário, e não nas metástases linfonodais (Jin et al., 1998; Kumar et al., 2008; Tandon et al., 2010; Luken, Conde e Carneiro. 2016).

Entre os 27 (34,2%) pacientes que recidivaram houve um número menor de recidiva nos pacientes com a proteína p53 negativa, com 9 (26,5%) casos. Entre os pacientes com a proteína p53 positiva, a recidiva foi de 18 (40%) casos, sendo considerável, porém não significativa ( $p = 0,238$ ) (Rasmussen et al., 2017).

Em relação à sobrevida, o percentual de óbitos geral foi de 15 (33,3%) casos nos pacientes com a proteína p53 positiva, e 6 (17,6%) casos nos pacientes com a proteína p53 negativa. O teste de Log-rank= 0,075 (quase significativo), com um declínio maior da curva de sobrevida dos pacientes com a proteína p53 positiva. Assim, os pacientes com a proteína p53 positiva têm 2,3 vezes mais chances de evoluir para óbito geral do que os pacientes com a proteína p53 negativa, com o valor de  $p = 0,083$  (não significativo), pelo Cox univariado. Quando ajustamos pela idade e sexo, os pacientes com a proteína p53 positiva têm 2,9 vezes mais chances de evoluir para óbito geral do que os pacientes com a proteína p53 negativa, com o  $p = 0,0474$ , sendo estatisticamente significativo.

Em relação ao óbito pela doença observamos o dobro de óbitos com a proteína p53 positiva, com 12 (26,7%) pacientes, comparado aos 6 (17,6%) pacientes com a proteína p53 negativa. O teste de Log-rank= 0,210, no qual os pacientes com proteína p53 positiva possuem 1,9 chances de evolução para óbito pela doença comparados aos pacientes com a proteína p53 negativa, com o valor de  $p = 0,216$ , não significativo. Quando ajustamos pela idade e sexo, os pacientes com a proteína p53 positiva têm 2,5 vezes mais chances de evolução para óbito pela doença, com o  $p = 0,106$ , não significativo.

Na estratificação do nível da proteína p53 o percentual encontrado de óbitos geral foi 6 (17,6%) pacientes com a proteína p53 negativa, 2 (28,6%) pacientes com a proteína p53 positiva nível A, 1 (12,5%) paciente com a proteína p53 positiva nível B e 12 (40%) pacientes com a proteína p53 positiva nível C. O teste de Log-rank= 0,168. Assim, temos que quanto maior o nível da proteína p53, menor a sobrevida. Porém não houve diferença significativa entre as curvas de sobrevida.

Ao compararmos o percentual de óbitos pela doença, observamos 6 (17,6%) pacientes com a proteína p53 negativa, nenhum óbito pela doença nos pacientes com a proteína p53 positiva nível B, 2 (28,6%) pacientes com a proteína p53 positiva nível A e 10 (33,3%) pacientes com a proteína p53 positiva nível C. O teste de Log-rank= 0,188, não havendo diferença entre as curvas de sobrevida.

Da mesma forma que fizemos com a cavidade oral, verificamos a relação concomitante das proteínas p53 e p16 na laringe. Nos pacientes com proteína p53 positiva nível A houve 1 (14,3%) paciente com a proteína p16 positiva grau 1, 1 (14,3%) paciente com proteína p16 positiva grau 2, 0 (0%) pacientes com proteína p16 grau 3 e 5 (71,4%) pacientes com proteína p16 grau 0. No total dos pacientes com a proteína p53 nível A tivemos 28,6% de proteína p16.

Nos pacientes com proteína p53 positiva nível B houve 0 (0%) pacientes com proteína p16 grau 1, 1 (12,5%) paciente com proteína p16 grau 2, 1 (12,5%) paciente com proteína p16 grau 3 e 6 (75%) pacientes com proteína p16 grau 0. No total dos pacientes com a proteína p53 nível B tivemos 25% de proteína p16.

Nos pacientes com proteína p 53 positiva nível C houve 9 (30%) pacientes com proteína p16 grau 1, 1 (3,3%) paciente com proteína p16 grau 2, 0 (0%) pacientes com proteína p16 grau 3 e 20 (66,7%) pacientes com proteína p16 grau 0. No total dos pacientes com a proteína p53 nível C tivemos 33,3% de proteína p16.

Nos pacientes com a proteína p53 negativa houve 7 (20,6%) pacientes com proteína p16 grau 1, 1 (2,9%) paciente com proteína grau 2, 1 (2,9%) paciente com proteína p16 grau 3 e 25 (73,5%) pacientes com proteína p16 grau 0. No total dos pacientes com a proteína p53 negativa tivemos 26,4% de proteína p16.

A média da proteína p16 presente nos carcinomas de laringe foi de 28,3%, no entrecruzamento das proteínas p53 e p16, sendo a maioria do grau 1.

Na laringe ficou mais explícito que a proteína p53 é risco para óbito geral e pela doença, principalmente após ajuste pela idade e sexo, o que nos sugere que o p53, dependendo de suas mutações, pode ser desfavorável à sobrevida, o que também foi bem documentado por Spafford et al. (1996) e Sarafoleanu et al. (2009), entre outros (Jin et al., 1998; Pruner, Pignataro e Carboni, 1998; Jackel et al., 2000; Kumar et al., 2008; Yang et al., 2014). Nossos resultados vão de encontro a outros autores que não encontraram o mesmo risco na sobrevida de pacientes com a proteína p53 positiva (Nadal et al., 1995; Hirvikoski et al., 1997; Friedman et al., 2001; Rodrigues et al., 2008; Simsek et al., 2014; Karpathiou et al., 2016; Sathiyamurthy et al., 2016).

Na laringe a proteína p16 positiva permaneceu menos relevante do que na cavidade oral. Observamos a maior expressão (33,3%) da proteína p16 no nível C da proteína p53, onde registramos maior número de óbitos pela doença, com 10 (33,3%) casos. Esse achado pode ser justificado por uma proteína p53 mais oncogênica, ou pela proteína p16 que sofreu desregulação, comprometendo a sua função de



supressora tumoral. Logo, o efeito de proteção da proteína p16 não parece tão evidente na laringe, quando comparada à sua ação nos tumores da cavidade oral. Provavelmente as melhores justificativas sejam a baixa expressividade da proteína p16 ou as mutações da própria proteína, além das “formas mais selvagens da proteína p53”, assim como outros elementos desfavoráveis à evolução da doença (Namazie et al., 2002; Yuen et al., 2002; Psyrri, DiMaio. 2008; Isayeva, Yufeng e Maswahu. 2012; Silva et al., 2012; Castellsagué et al., 2016; Hernandez et al., 2016).

### 5.2.2 Proteína p16

Na laringe, similar ao estudo anterior, o gênero não mostrou diferença entre a expressividade da proteína p16 ( $p = 1,000$ ). A localização não teve nenhuma diferença estatística entre os pacientes com as proteínas p16 positiva e p16 negativa ( $p = 0,669$ ). Vale a pena ressaltar o menor percentual da proteína p16 na glote. Registramos um leve percentual da proteína p16 positiva na supra glote, em 7 (30,4%) casos, e 5 (21,7%) casos de tumores transglóticos. Esses dados, embora sejam pequenas amostras, vão ao encontro do estudo realizado por Castellsagué et al. (2016). Eles documentaram que subsítios proximais à orofaringe apresentavam maior percentual de proteína p16 e possivelmente o HPV-16.

Em relação ao grau da proteína p16 no grupo de 79 pacientes com carcinoma espinocelular de laringe, constatamos 17 (21,5%) casos de proteína p16 positiva grau 1, 4 (5,1%) casos de proteína p16 grau 2 e apenas 2 (2,5%) casos de proteína p16 grau 3. Esses dois últimos podem estar relacionados ao HPV tipo 16 (Stephen et al., 2013).

A presença da proteína p16 não mostrou relevância estatística e, novamente, a cirurgia foi o tratamento padrão dos nossos pacientes ( $p = 0,174$ ).

No estadiamento houve um maior número de pacientes com estágio avançado com a proteína p16 negativa. Entre os pacientes com a proteína p16 positiva houve um número pouco maior de pacientes em estádios III e IV, sem significado estatístico ( $p = 0,325$ ). O mesmo ocorreu em relação ao sítio primário do tumor, onde ocorreu maior número de T3 e T4, em 14 (25%) casos, com a ausência da proteína p16, sem relevância estatística ( $p = 0,08$ ). As explicações desses resultados novamente sugerem a baixa expressividade da proteína p16, mutações nos seus códons ou a presença de outros marcadores como bcl-2, EGFR, Ki-67, entre outros que podem

desencadear um comportamento biológico mais agressivo (Pruner, Pignataro e Carboni, 1998; Geisler et al., 2002; Yuen et al., 2002; Reimers et al., 2007; Rodrigues et al., 2008; Silva et al., 2012; Castellsagué et al., 2016).

Na avaliação da disseminação linfonodal houve maior número de linfonodos negativos, principalmente por serem tumores glóticos. A presença da proteína p16 não mostrou nenhuma importância estatística nas metástases linfonodais. O maior percentual de linfonodos negativos foi computado na ausência da proteína p16. Esse fato deve-se mais pela escassez da circulação linfática na glote do que pela influência da proteína p16. Entre os pacientes com a proteína p16 positiva, a proporção de linfonodos positivos foi menor, porém sem diferença em relação aos pacientes com linfonodos negativos ( $p = 0,276$ ). Na análise do linfonodo (N) houve uma proporção levemente maior de linfonodos comprometidos para os pacientes com a proteína p16 negativa, também sem inferência estatística ( $p = 0,403$ ). Na laringe a proteína p16 não mostrou nenhuma correspondência na disseminação linfática.

Nesse estudo, a recidiva foi maior nos pacientes com a proteína p16 negativa, em 17 (30,4%) pacientes, comparados aos 10 (43,5%) pacientes com a proteína p16 positiva que recidivaram ( $p = 0,302$ ). Aqui também a presença da proteína p16 não mostrou diferença na recidiva.

Em relação à sobrevida observamos 21 (26,6%) casos para óbito geral, nos quais 14 (25%) casos eram pacientes com proteína p16 negativa e 7 (30,4%) casos com proteína p16 positiva. O teste de Log-rank= 0,812, onde observamos que os pacientes com proteína p16 positiva tiveram no teste Cox univariado 1,1 vezes mais chances de evolução para óbito geral do que os pacientes p16 negativo ( $p = 0,812$ ). Ajustado pela idade e sexo, os pacientes com a proteína p16 positiva mostraram 1,2 vezes mais chances de evoluir para óbito geral do que os pacientes com a proteína p16 negativa ( $p = 0,700$ ). Sem significado estatístico, em todos os testes.

Na sobrevida, comparando os óbitos pela doença, houve 12 (21,4%) casos de pacientes com proteína p16 negativa e 6 (26,1%) casos de pacientes com proteína p16 positiva. O teste de Log-rank= 0,834, onde observamos, da mesma forma anterior, que os pacientes com a proteína p16 positiva tem 1,1 mais chances de evolução para óbito pela doença do que os pacientes com a proteína p16 negativa ( $p = 0,834$ ). Cox ajustado pela idade e sexo, os pacientes com a proteína p16 positiva tem 1,17 vezes mais chances de evolução para óbito pela doença, ( $p=0,750$ ), não significativo em todos os testes.

Na estratificação do grau da proteína p16 observamos o maior número de óbitos geral para 14 (25%) pacientes com a proteína p16 grau 0, 6 (35,3%) pacientes com a proteína p16 grau 1, nenhum caso para pacientes com proteína p16 grau 2 e 1 (50%) paciente com proteína p16 grau 3. O teste de Log-rank= 0,279, sem diferença nas curvas de sobrevida.

Em relação a óbito por doença observamos um maior número de óbitos para pacientes com a proteína p16 negativa, com 12 (21,4%) casos, 5 (29,4%) pacientes com proteína p16 grau 1, nenhum caso de paciente com proteína p16 grau 2 e 1 (50%) paciente com proteína p16 grau 3. O teste de Log-rank= 0,281, também sem diferença estatística.

Esses resultados da proteína p16, no carcinoma de células escamosas da laringe, foram diferentes comparados aos resultados na cavidade oral. Na laringe observamos duas características: a expressividade da proteína p16 foi menor e o aspecto protetor não se reproduziu na sobrevida dos pacientes. A chance de óbito foi maior nos pacientes com a proteína p16 positiva (1,1; 1,2 vezes) do que nos pacientes com a proteína p16 negativa. Ou seja, a presença da proteína p16 na laringe não mostrou ser protetora e sim de risco, o que pode ser explicado por mutações próprias da proteína ou pela sua inativação por fatores nocivos descritos anteriormente, além da presença de outras proteínas envolvidas na carcinogênese da laringe (Geisler et al., 2002; Namazie et al., 2002; Yuen et al., 2002; Worsham et al., 2006; Lassen et al., 2009; Smith et al., 2010; Karpathiou et al., 2016; Sathiyamurthy et al., 2016).

No estudo das quatro situações das proteínas na laringe o predomínio foi das proteínas p53 positiva e p16 negativa na glote, em 19 (61,3%) casos, seguido por 14 (56%) casos de proteínas p53 e p16 negativas, 7 (50%) casos de proteínas p53 positiva e p16 positiva e menor número de pacientes com somente a proteína p16 positiva na glote, com 4 (44,4%) casos. Nas demais regiões apenas a supra glote teve um número maior de proteínas negativas, com 7 (28%) casos, e a proteína p16 isolada foi registrada em 3 (33,3%) casos, sem significado estatístico considerando a localização para todos marcadores ( $p= 0,943$ ). Embora o “n” amostral seja pequeno na estratificação das variáveis, destacamos o maior percentual com os 3 (33,3%) casos com a proteína p16 positiva, na supra glote, fazendo uma referência à presença da proteína p16 em locais proximais à orofaringe, como foi descrito no estudo multi-institucional realizado por Castellsagué et al. (2016).

No estadiamento o estágio III e IV foi numericamente maior nos pacientes com a proteína p53 positiva e a proteína p16 negativa, em 16 (51,6%) casos. A menor frequência numérica dos estádios III e IV foi entre os pacientes com a proteína p53 negativa e p16 positiva, com 6 (66,7%) casos, sem diferença estatística ( $p = 0,763$ ). O mesmo achado reproduziu-se na classificação dos tumores (T), onde maior número de T4, 10 (32,3%) casos, eram de pacientes com as proteínas p53 positiva e p16 negativa ( $p = 0,267$ ). Sem relevância estatística.

Na disseminação linfática houve uma leve predominância de linfonodos positivos para os pacientes com as proteínas p53 negativa e p16 negativa, em 8 (32%) casos, seguido por pacientes com as proteínas p53 positiva e p16 negativa, em 6 (19,4%) casos, 5 (55,6%) casos de proteínas p16 positiva e p53 negativa, e o menor número de linfonodos positivos foi para os pacientes com ambas proteínas positivas, em 4 (28,6%) casos ( $p = 0,220$ ), sem significado estatístico.

De forma semelhante ocorreu na característica do linfonodo (N), onde houve maior número de N1 com ambas proteínas negativas em 4 (16%) casos e 2 (6,5%) casos de pacientes com proteína p53 positiva e p16 negativa. Houve um maior número N2b em pacientes com somente a proteína p53 positiva, contabilizando 3 (9,7%) casos. Na avaliação total, não houve significado estatístico ( $p = 0,303$ ).

Na análise da recorrência da doença os pacientes com a proteína p53 positiva e a proteína p16 negativa tiveram o maior número de recidivas, com 11 (35,5%) casos, e o menor número percentual de recidiva foi na ausência das proteínas p53 e p16, com 6 (24%) casos. Porém, não houve significância estatística em todas as comparações ( $p = 0,443$ ).

Em relação à sobrevida temos uma frequência numérica maior de óbitos geral com os pacientes com as proteínas p53 positiva e p16 negativa, com 10 (32,3%) casos, e um menor número de óbitos nos pacientes com ambas proteínas negativas, em 4 (16%) casos. O teste de Log-rank= 0,350.

Para óbitos pela doença houve também um maior número de óbitos para os pacientes com proteínas p53 positiva e p16 negativa, com 8 (25,8%) casos, e o menor número para os pacientes com ambas proteínas negativas, com 4 (16, %) casos. O teste de Log-rank= 0,639.

Em toda a análise não houve diferença estatística entre as curvas de sobrevida tanto para óbito geral como para óbito pela doença. Entretanto, podemos ressaltar que a melhor curva de sobrevida ficou evidente nos pacientes com ambas proteínas

negativas. A segunda melhor curva foi dos pacientes com a proteína p16 positiva isolada. A terceira curva dos pacientes com as duas proteínas positivas, praticamente coincidente com a curva da pior sobrevida, que são os pacientes com somente a proteína p53 positiva.

As proteínas p53 e p16 na laringe demonstraram características interessantes, uma vez que ambas parecem sugerir risco na gênese de tumores na laringe, embora a proteína p16 possa ser menos intensa. As razões são variadas, desde a pouca expressividade, mutações presentes como a hipermetilação, deleções propiciando a desregulação da proteína p16 no ciclo celular, ou até mesmo a interferência de outro marcador como a própria proteína p53, bcl-2, ciclina D1, EGFR, entre outros.

Os estudos ratificam a pouca fidelidade prognóstica da proteína p16 no desenvolvimento das neoplasias malignas na laringe. A hiper expressividade da proteína p53 e/ou as suas mutações sugerem uma pior sobrevida nos pacientes com carcinoma de células escamosas na laringe. Independente das limitações do estudo, como a não identificação genética das mutações, a não comprovação do vírus HPV-16 e o número pequeno de amostras na estratificação de algumas variáveis, fica bem claro a importância dessas proteínas. Em especial, a presença da proteína p53 isolada ou associada a outros marcadores, no CEC da laringe, desde as lesões iniciais até os tumores mais infiltrativos (Spafford et al., 1996; Jin et al., 1998; Pruneri, Pignataro, Carboni, 1998; Jackel et al., 2000; Geisler et al., 2002; Kumar et al., 2008; Colombo, Rahal, 2009; Sarafoleanu et al., 2009; Smith et al., 2010; Silva et al., 2012; Mondal et al., 20013; Britto, Paula, Saddi. 2014; Castellsagué et al., 2016; Hernandez et al., 2016; Luken, Conde, Carnero. 2016; Karpathiou et al., 2016).

### **5.3 Faringe**

De forma similar aos pacientes com CEC na cavidade oral e na laringe, os pacientes com CEC na faringe apresentaram várias características comuns. A idade média e a mediana foi praticamente a mesma, de 61,0 anos. 84 (92,3%) pacientes pertenciam ao gênero masculino. O tabagismo diário em 61 (67%) casos e 21 (23,1%) pacientes ex-tabagistas. Em relação ao etilismo, 26 (28,6%) pacientes etilistas ativos e 50 (54,9%) pacientes tinham história previa de etilismo (Goldenberg, Golz e Joachms. 2003; Alvarenga et al., 2008; Perdomo et al., 2016; Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2018).

A orofaringe foi a localização mais comum do carcinoma de células escamosas, com 63 (69,2%) casos, seguida pela hipofaringe, com 26 (28,6%) casos, e somente 2 (2,2%) casos na nasofaringe. A amígdala foi o principal subsítio mais frequente, com 24 (26,4%) casos. A maioria dos carcinomas eram moderadamente diferenciados, estando em 56 (61,5%) casos. 27 (29,7%) tumores eram carcinomas pouco diferenciados e apenas 8 (8,8%) eram carcinomas bem diferenciados. Observamos nesse grupo um maior número de carcinomas pouco diferenciados, sugerindo uma doença mais agressiva e indiferenciada na faringe (Pukkila et al., 2002; Settle et al., 2009a; Settle et al., 2009b; Smith et al., 2010; Ernoux-Neufcoeur et al., 2011; Broglie et al., 2013; Wendt et al., 2014).

No nosso estudo a expressividade das proteínas p53 e p16 mostrou uma frequência de 52 (57,1%) e 31 (34,1%) casos, respectivamente. A expressividade da proteína p53 mostrou-se inferior, comparada aos estudos de Sathyamurthy et al. (2016), e certa compatibilidade com o trabalho de Karpathiou et al. (2016). Em relação à expressividade da proteína p16, nossos resultados foram inferiores aos achados de Stephen et al. (2013), que foi de 65%, especialmente na orofaringe, e superior ao trabalho de Karpathiou et al. (2016) (Stephen et al., 2013; Karpathiou et al., 2016; Sathyamurthy et al., 2016).

O nível C da proteína p53 foi prevalente em 32 (35,2%) casos, sugerindo uma perpetuação de processos oxidativos celulares na mucosa faríngea, seguida pela menor expressividade da proteína nível A e, por último, nível B. Os níveis dessas proteínas são mediados pela produção de enzimas e translocações gênicas, representadas principalmente pelas trocas de aminoácidos, perda da heterozigose, hipermetilação, entre outras modificações sofridas pelo DNA nas células da mucosa faríngea. Essas mudanças no DNA são bem fundamentadas por importantes estudos sobre o carcinoma na cavidade oral, laringe, orofaringe, hipofaringe e esôfago (Lane e Crawford, 1979; Gao e Zelenka, 1997; Levine, 1997; Nadal et al., 1995; Weinert, 1998; Fette-Conte e Salles, 2002; Geisler et al., 2002; Pukkila et al., 2002; Ruiz et al., 2006; Binato, 2007; Smith et al., 2010; Tandon et al., 2010; Wang et al., 2012; Chen et al., 2014; Broglie et al., 2013; Shinohara et al., 2014; Luken, Conde, Carnero, 2016; Karpathiou et al., Sathyamurthy et al., 2016; Wang et al., 2016; Patel et al., 2018).

Da mesma forma que a cavidade oral e a laringe, os 31 (34,1%) pacientes com a proteína p53 positiva e a proteína p16 negativa representaram a maioria dos casos. Em segundo lugar, 29 (31,9%) pacientes com as proteínas p53 e p16 negativas,

seguido por 21 (23,1%) casos de proteínas p53 e p16 positivas, com apenas 10 (11%) casos com a proteína p16 positiva isolada. Nesse grupo da faringe também associamos a hiper expressividade da proteína p53 com os fatores de risco tradicionais como o tabagismo, o etilismo, além do chimarrão (Sul do Brasil). Ademais, tivemos a menor frequência da proteína p16 positiva grau 3, relacionada ao HPV-16. Nossos resultados possuem alguns aspectos análogos com os estudos de outros autores (Geisler et al., 2002; Kreimer et al., 2005; Ruiz et al., 2006; Settle et al., 2009a; Smith et al 2010; Broglie et al., 2013; Brito, Paula e Saddi, 2014; Castellsagué et al., 2016; Perdomo et al., 2016).

A idade média dos nossos pacientes em relação à positividade das proteínas não apresentou diferença em relação à idade média geral do paciente com CEC na via aérea digestiva superior, com as idades médias de 61,5 anos e de 60,6 anos para as proteínas p53 ( $p = 0,561$ ) e p16 ( $p = 0,562$ ) respectivamente, sem significado estatístico (Karpathiou et al., 2016).

Na estratificação do grau da proteína p16, a maior frequência foi a ausência da proteína p16 ou a proteína p16 grau 0 em 60 (65,9%) pacientes com carcinoma de células escamosas, seguida por 21 (23,1%) pacientes com tumores com a proteína p16 grau 1, 4 (4,4%) pacientes com tumores com a proteína p16 grau 2 e 6 (6,6%) pacientes com tumores com a proteína p16 grau 3. No nosso meio ainda é grande a interferência de fatores de risco como o tabagismo e o etilismo, embora haja gradualmente relatos de carcinoma de células escamosas por HPV-16 na orofaringe.

Nossos dados corroboram com as casuísticas de países da América Latina, onde há uma menor frequência da proteína p16 hiper expressa (grau 3) nos carcinomas de células escamosas, comparada a publicações dos EUA e da Europa sobre o carcinoma na orofaringe (Syrjanen et al., 1983; Von Knebel, 2002; Begun et al., 2003; Smeets et al., 2007; Nasman et al., 2009; Marur et al., 2010; Nguyen et al., 2010; Weinberger et al., 2010; Wittekindt et al., 2012; Cerezo et al., 2013; Castellsagué et al., 2016; Karpathiou et al., 2016; Perdomo et al., 2016).

### 5.3.1 Proteína p53

O carcinoma de células escamosas com a proteína p53 positiva teve maior prevalência no gênero masculino, semelhante ao carcinoma da cavidade oral e da laringe, sem importância estatística, comparada à ausência da proteína p53 ( $p =$

0,456). Esses resultados são coerentes se considerarmos o fato desse tipo de tumor ser mais frequente no gênero masculino e a estreita relação da proteína p53 com o tabagismo e o etilismo (Goldenberg, Golz e Joachms, 2003; Alvarenga et al., 2008; Perdomo et al., 2016).

Na análise da localização, a orofaringe teve a maior expressividade da proteína p53, com 33 (63,5%) casos, seguido pela hipofaringe, com 17 (32,7%) casos, e 2 (3,8%) casos da nasofaringe, sem significância estatística ( $p = 0,347$ ). Nos subsítios, a hipofaringe teve a maior frequência da proteína p53 positiva, em 17 (32,7%) casos, seguida pela amígdala, que teve o mesmo valor de 12 pacientes para a proteína p53 positiva (23,1%) e para a p53 negativa (30%) ( $p = 0,604$ ). Tanto na orofaringe como na hipofaringe a expressividade da proteína p53 não mostrou grande diferença em valores estatísticos, comparada aos pacientes com a proteína p53 negativa. Talvez isso possa ser explicado por uma resposta ampliada do gene P53 às alterações epiteliais, dependendo do agente e do local onde está ocorrendo o evento (Fett-Conte e Salles, 2002; Pukkila et al., 2002; Binato, 2007; Ang et al., 2010; Ernoux-Neufcoeur et al., 2011; Broglie et al., 2013; Parise Jr. et al., 2004; Wang et al., 2016; Lee et al., 2018; Patel et al., 2018).

Em relação ao tratamento não houve significado estatístico entre a cirurgia com adjuvancia e o tratamento oncológico clínico nos pacientes com CEC com a proteína p53 positiva e naqueles com a proteína p53 negativa ( $p = 0,399$ ). Da mesma forma, não houve significância com a cirurgia como modalidade principal nos 25 (48,1%) pacientes com a proteína p53 positiva e nos 23 (59%) pacientes com a proteína p53 negativa ( $p = 0,396$ ).

A expressividade da proteína p53 prevaleceu no estadiamento mais avançado dos pacientes: 46 (88,5%) pacientes com a proteína p53 positiva e 30 (76,9%) pacientes com a proteína p53 negativa encontravam-se em estágio III e IV ( $p = 0,163$ ), sendo mais expressa proporcionalmente nos tumores T4, 13 (25%) pacientes com proteína p53 positiva, comparados aos 5 (12,8%) pacientes com proteína p53 negativa, sem significado estatístico ( $p = 0,301$ ). Nossos resultados mostram a expressividade mais acentuada da proteína p53, desde os tumores T1 até os tumores T4, o que ratifica o seu papel em todas as etapas da carcinogênese (Geisler et al., 2002; Pukkila et al., 2002; Ruiz et al., 2006; Binato, 2007; Ernoux-Neufcoeur et al., 2011; Sathyamurthy et al., 2016; Ottria et al., 2018).



Na disseminação linfonodal houve uma maior frequência de linfonodos positivos nos pacientes com a proteína p53 positiva, com 41 (78,8%) casos, comparados aos 29 (74,4%) casos de pacientes com a proteína p53 negativa, com valor de  $p = 0,625$ , sem significância estatística. Também houve uma maior frequência de bilateralidade e linfonodos N3 na disseminação linfonodal entre os pacientes com a proteína p53 positiva, com valor de  $p = 0,313$ , sem importância estatística. Apesar de observarmos uma maior expressividade da proteína p53 positiva em linfonodos positivos, parece que as altas concentrações da proteína não refletem a disseminação linfática. Os linfonodos comprometidos estão mais relacionados a uma circulação linfática bem desenvolvida, à invasão angiolinfática, à invasão perineural, à disseminação submucosa e aos elementos desfavoráveis da própria neoplasia como outros marcadores de prognóstico reservado (Fett- Conte, Salles, 2002; Pukkila et al., 2002; Ernoux- Neufcoeur et al., 2011; Wang et al., 2016).

Na recidiva do carcinoma na faringe observamos 20 (38,5%) casos de pacientes com proteína p53 positiva que não recidivaram, comparados aos 11 (28,2%) pacientes com proteína p53 negativa ( $p = 0,374$ ), sem importância estatística. Outro resultado que chama a atenção é a significância estatística observada em relação à presença de um segundo tumor primário nos pacientes com a proteína p53 negativa, com valor de  $p = 0,013$ . Ou seja, a ausência da proteína p53 no carcinoma, principalmente na orofaringe, sugere uma pior evolução, com mais recidivas e maior propensão a um segundo tumor primário na região da cabeça e pescoço. Esses achados são compatíveis com autores que obtiveram resultados favoráveis com a presença da proteína p53 (Hirvikoski et al., 1997; Parise Jr. et al., 2004; Sathyamurthy et al., 2016; Rasmussen et al., 2017).

Em relação à sobrevida, registramos um percentual de óbitos geral de 27 (51,9%) pacientes com a proteína p53 positiva e de 22 (56,4%) pacientes com a proteína p53 negativa. O teste de Log-rank= 0,963. O teste Cox univariado com o valor de  $p = 0,963$  exibiu pacientes com a proteína p53 positiva com 0,99 chances de evolução para óbito geral. No Cox ajustado pelo sexo e idade mostrou o valor de  $p = 0,998$ . Logo, pacientes com a proteína p53 positiva exibiram 1 (uma) chance de evolução para óbito geral. No percentual de óbitos pela doença houve um discreto percentual para os 27 (51,9%) pacientes com a proteína p53 positiva que evoluíram para óbito pela doença, comparados aos 19 (48,7%) pacientes com a proteína p53 negativa. Teste de Log-rank= 0,637. Com teste Cox univariado com o valor de  $p =$

0,638, os pacientes com a proteína p53 positiva tiveram 1,15 vezes mais chances de evoluir para óbito pela doença.

No modelo Cox ajustado pelo sexo e idade tivemos o valor de  $p = 0,609$  e os pacientes com a proteína p53 positiva mostraram 1,17 vezes chances de evolução para óbito pela doença. Esses resultados sugerem uma diminuição do risco, além de chamar a atenção para uma menor agressividade biológica com a proteína p53, considerando o sítio primário da neoplasia (Parise Jr. et al., 2004; Sathyamurthy et al., 2016; Rasmussen et al., 2017).

No nível da expressividade da proteína p53 observamos 5 (35,7%) pacientes com a proteína p53 positiva nível A, 3 (50%) pacientes com a proteína p53 positiva nível B, 19 (59,4%) pacientes com a proteína p53 positiva nível C e 22 (56,4%) pacientes com a proteína p53 negativa que evoluíram para o óbito geral. O teste de Log-rank= 0,716. Em relação ao óbito pela doença observamos 5 (35,7%) pacientes com a proteína p53 positiva nível A, 3 (50%) pacientes com proteína p53 positiva nível B, 19 (59,4%) pacientes com a proteína p53 positiva nível C e 19 (48,7%) pacientes com proteína p53 negativa que evoluíram para óbito pela doença. O teste de Log-rank= 0,633. Nenhum deles com significância estatística.

Na análise da sobrevida chama atenção o percentual de óbitos gradativamente maior quanto mais expressa a positividade da proteína p53, assim como o número de óbitos na ausência da proteína p53. Esse achado identifica a proteína p53 como risco, embora não tão intenso como foi demonstrado na cavidade oral e na laringe. As justificativas podem estar na função supressora tumoral dessa proteína p53, mais evidente com menos deleções genéticas quando os carcinomas localizam-se na faringe, caracterizando um menor risco para o óbito geral ou pela doença. A ausência da proteína p53 predispõe uma falha na regulação do ciclo celular, impossibilitando a apoptose das células anômalas.

Outro aspecto interessante é a concomitância da proteína p16, em particular o grau 1, que somada aos outros níveis, grau 2 e grau 3, perfaz uma média de 35,6% entre os pacientes p53 positivo e negativo. Considerando que em 14 pacientes com a proteína p53 positivo nível A havia 3 (21,4%) pacientes com a proteína p16 grau 1, 1 (7,1%) paciente grau 2, 2 (14,3%) pacientes com a proteína p16 grau 3 e 8 (57,1%) pacientes grau 0. No total 6 (42,8%) pacientes com proteína p16 positiva.

Nos 6 pacientes com a proteína p53 positiva nível B havia 2 (33,3%) pacientes com a proteína p16 positiva grau 1, 0 (0%) pacientes com a proteína graus 2 e 3, e 4

(66,7%) pacientes com a proteína p16 grau 0. No total 2 (33,3%) pacientes com proteína p16 positiva.

Nos 32 pacientes com a proteína p53 positiva nível C havia 10 (31,3%) pacientes com a proteína p16 positiva grau 1, 2 (6,3%) pacientes com proteína p16 grau 2, 1 (3,1%) paciente com a proteína p16 grau 3 e 19 (59,4%) pacientes com proteína p16 grau 0. No total de 13 (40,7%) pacientes com a proteína p16 positiva.

Nos 39 pacientes com a proteína p53 negativa havia 6 (15,4%) pacientes com a proteína p16 grau 1, 1 (2,6%) paciente com o grau 2, 3 (7,7%) pacientes com a proteína p16 grau 3 e 29 (74,4%) pacientes com a proteína p16 grau 0. No total a proteína p16 positiva estava presente em 10 (25,7%) casos.

No nosso estudo observamos que os pacientes com a proteína p16 positiva graus 2 e grau 3 tiveram o menor índice de óbitos, o que não se reproduziu nos pacientes com a proteína p16 positivo grau 1, independente do sítio neoplásico de origem. O grau 1 da proteína p16 parece não oferecer proteção e a própria ausência da proteína p16 na regulação do ciclo celular torna o prognóstico mais reservado, com maior índice de óbitos (Namazie et al., 2002; Worsham et al., 2006; Ang et al., 2010; Laco et al., 2012; Stephen et al., 2013; Britto, Paula e Saddi. 2014; Deng et al., 2014; Karpathiou et al., 2016).

### 5.3.2 Proteína p16

Na totalização dos 31 (34,1%) casos positivos para a proteína p16 não houve relevância estatística quanto ao gênero, o valor de  $p = 1,000$ . O CEC com a proteína p16 na faringe ainda é mais frequente no gênero masculino, apesar das mudanças de estilo de vida observadas entre as mulheres (Castellsagué et al., 2016).

Em relação ao subsítio, não houve grandes diferenças entre a amígdala, palato mole, base de língua e parede posterior. São poucas as semelhanças entre os nossos resultados com autores da Europa, como Castellsagué et al. (2016). Esses autores realizaram um estudo multi-institucional, no qual enfatizaram a expressividade de marcadores como a proteína p16 e o HPV-16 nos subsítios e regiões proximais à orofaringe. Nossas amostras são pequenas nas estratificação das variáveis. Porém, observamos 42,9% da proteína p16 na área retro molar e 30,4% da proteína p16 na supra glote, conforme Castellsagué et al. (2016). Na nasofaringe nossos dois pacientes eram proteína p16 grau 0. Na hipofaringe identificamos 6 (19,4%) casos da

proteína p16 positiva. Ou seja, a expressividade da proteína p16 é muito inferior na hipofaringe, conforme documentado por autores como Ernoux-Neufcoeur et al. (2011) e Wendt et al. (2014).

Ao analisarmos as três regiões da faringe, identificamos uma maior frequência de pacientes com proteína p16 grau 0, ou ausência de proteína, comparadas aos pacientes com proteína p16 positiva, com o valor de  $p = 0,244$ . No Brasil a notificação de carcinoma de células escamosas por HPV-16/proteína p16 positivos na cabeça e pescoço é ainda imprecisa. Entretanto, é menos incidente se confrontada com as publicações dos EUA e da Europa, conforme Castellsagué et al. (2016), Karpathiou et al. (2016), Perdomo et al. (2016), Fakhry et al. (2017), entre outros (Smeets et al., 2007; Fakhry et al., 2008; Settle et al., 2009a; Weinberger et al., 2010; Abrahão et al., 2011; Chernock et al., 2011; Schrank et al., 2011; Isayeva, Li Yufeng e Maswahu, 2012; Laco et al., 2012; Wendt et al., 2014; Fakhry et al., 2017).

Em relação ao tratamento tivemos uma maior proporção de cirurgia entre os pacientes com a proteína p16 positiva, o que revelou uma significância estatística com o valor de  $p = 0,015$ , comparados aos pacientes com proteína p16 negativa. Esse resultado difere de outros estudos como Settle et al. (2009b), Ang et al. (2010), Broglie et al. (2013), Cerezo et al. (2013), Stephen et al. (2013), entre outros, onde a maioria dos pacientes p16 positivo foram tratados com a radioterapia e quimioterapia concomitantes. Nossas justificativas são baseadas no estudo observacional prospectivo, sem interferência no tratamento, e por termos um número maior de tumores T1 e T2 entre os pacientes com a proteína p16 positiva, com 20 (64,6%) casos, com relevância estatística ( $p = 0,046$ ), em especial para os tumores T1 (Karpathiou et al., 2016).

No estadiamento a maioria dos pacientes encontrava-se em estágio III e IV, tanto com a proteína p16 positiva como negativa, porém mais acentuadamente com essa última, sem relevância estatística ( $p = 1,000$ ). O aspecto do tumor no sítio primário mostrou os menores tumores como T1 na presença da proteína p16, com significado estatístico ( $p = 0,04$ ).

Na disseminação linfática houve um predomínio de linfonodos comprometidos nos pacientes com a proteína p16 negativa, em 45 (75%) casos. Entre os pacientes com a proteína p16 positiva também registramos maior frequência de metástases linfonodais, porém sem significado estatístico ( $p = 0,609$ ). Sob aspecto do linfonodo, o nosso maior comprometimento foi na ausência da proteína p16, com 18 (30%) casos

de N2b. Na presença da proteína p16 computamos 8 (25,8%) casos de N1, sem significado estatístico ( $p = 0.574$ ). Nossos primeiros resultados em relação aos linfonodos exibem diferenças em relação a outros autores quanto à frequência da proteína p16 e o comprometimento linfonodal (Begun et al., 2003; Ang et al., 2010; Stephen et al., 2013; Deng et al., 2014). Entretanto, também obtivemos resultados compatíveis com autores como Britto, Paula e Saddi (2014), Karpathiou et al. (2016) e Wang et al. (2016).

A presença da proteína p16 não mostrou nenhuma relevância nos casos não recidivados. Contudo, um maior número de recidivas aconteceu com os pacientes com a proteína p16 negativa. O valor de  $p = 0,160$  (Rasmussen et al., 2017).

Em relação à sobrevida, os óbitos gerais ocorreram num percentual maior que o dobro nos pacientes com a proteína p16 grau 0, teste de Log-rank= 0,380. Teste Cox univariado, valor de  $p = 0,382$  e Cox ajustado pelo o sexo e idade com valor de  $p = 0,367$ , sem significado estatístico. Porém, ressaltamos que os pacientes com a proteína p16 positiva tinham 0,8 vezes chances de evoluir para óbito geral. Na análise de óbitos pela doença houve o dobro de óbitos nos pacientes com a proteína p16 grau 0, comparados aos pacientes com a proteína p16 positiva, teste de Log-rank= 0,559. Teste Cox univariado, valor de  $p = 0,560$ , e Cox ajustado pelo sexo e a idade com valor de  $p = 0,552$ , sem significado estatístico. Os pacientes com a proteína p16 positiva tem 0,8 e 0,83 (menor que 1) vezes chances de evolução para óbito pela doença, após ajuste do Cox univariado, pelo sexo e idade.

Ao analisarmos a sobrevida em relação ao grau da expressividade da proteína p16 observamos um maior percentual de óbitos geral quanto menor a expressividade da proteína p16 ou ausência da mesma, com teste de Log-rank= 0,663. Da mesma maneira ocorreu com os óbitos pela doença, onde o percentual também foi maior com a menor expressividade ou ausência da proteína p16, com teste de Log-rank= 0,753, embora sem significado estatístico para ambos testes.

Nossos resultados sobre a proteína p16 demonstram um perfil de proteção no carcinoma de faringe, em especial na orofaringe. Houve um maior número de pacientes com proteína p16 grau 1 e os melhores resultados foram nos pacientes com a proteína p16 grau 2 e grau 3. Como bem documentado por outros autores, quanto maior a expressividade da proteína p16 nos carcinomas de orofaringe, melhor é a sobrevida. Entretanto, o mesmo não se observa na hipofaringe (Weinberger et al., 2006; Smeets et al., 2007; Nasman et al., 2009; Ang et al., 2010; Marur et al., 2010;

Smith et al.,2010; Ernoux-Neufcoeur et al 2011; Silva et al., 2012; Broglie et al., 2013; Stephen et al., 2013; Deng et al., 2014; Shinohara et al., 2014; Wendt et al., 2014; Lee et al., 2018).

A proteína p16, como inibidora das quinases dependentes da ciclina, ao inibir o complexo ciclina D1/CDK4/6 bloqueia o ciclo celular G1-S, regulando a proliferação celular. Quando ocorre ação das oncoproteínas como a E7 do HPV, há a interrupção da fosforilação da proteína Rb, gerando um maior aumento da proteína p16 e, por consequência, a interrupção do ciclo G1-S. Os efeitos dos oncovírus de alto risco, como o HPV-16 e HPV-18, propiciam uma maior produção da proteína p16 para inibir o ciclo celular, porém diferentes mutações como hipermetilação, deleção ou heterozigose, entre outras, podem alterar tanto o locus gênico como o seu conteúdo proteico, determinando graus variados da expressividade da proteína p16 ou mesmo a sua inatividade em relação ao ciclo celular, conforme revisão realizada por Britto, Paula e Saddi (2014).

Em nosso trabalho a proteína p16 foi identificada em 31 (34,1%) casos, sendo 21 (23,1%) casos com a proteína p16 positiva grau 1, 4 (4,4%) casos proteína p16 grau 2 e 6 (6,6%) casos proteína p 16 grau 3. Dentre esses casos provavelmente a relação com o HPV- 16 sejam os casos da proteína p16 positiva grau 3. Talvez os casos da proteína p16 grau 2 correspondam a outros tipos de oncovírus, não necessariamente os de alto risco. Ao considerarmos a proteína p16 grau 3 relacionada ao HPV-16 o nosso registro é bem menor ao ser comparado com outros autores, tais como Kreimer et al. (2005), Marur et al. (2010), Nguyen et al. (2010), Cerezo et al. (2013), Stephen et al. (2012), Stephen et al., (2013) e Karpathiou et al. (2016). Por outro lado, a presença da proteína p16 na orofaringe de 25 (80,6%) casos de carcinoma favoreceu melhores resultados. Não obtivemos os mesmos valores com os tumores localizados na laringe provavelmente pela menor expressividade da proteína p16, já enfatizada por Geisler et al. (2002), Yuen et al. (2002), Smith et al. (2010), Stephen et al. (2013), Castellsagué et al. (2016) e Hernandez et al. (2016).

Outro fato relevante foi a maior frequência da proteína p16 nos tumores T1, o que solidifica a função supressora da proteína nas etapas iniciais da proliferação celular, de acordo com Karpathiou et al. (2016). A disseminação linfonodal estava presente entre os pacientes com a proteína p16 positiva. Entretanto, o maior comprometimento foi constatado na ausência da proteína. Esse aspecto comprova que graus variados da expressividade da proteína p16, ou até mesmo a sua ausência,

podem estar interligados à desregulação da mesma e, portanto, agravando a sobrevida desses pacientes, conforme as publicações de Yuen et al. (2002), Settle et al. (2009a), Settle et al. (2009b), Stephen et al. (2013), entre outros.

A proteína p16 como marcador é considerada positiva no prognóstico dos pacientes por sua forte relação com o HPV-16 positivo. Conforme Fakhry et al. (2008), deve-se à boa resposta ao tratamento por radioterapia e quimioterapia concomitantes, mesmo diante de metástases linfonodais volumosas. Logo, os conceitos favoráveis à sobrevida e o tempo livre de doença, em relação a proteína p16, são bem aceitos, ainda que em 15% a 20% dos casos de proteína p16 positiva não haja a confirmação do HPV-16, conforme Smeets et al. (2007). Esses aspectos sugerem que a presença da proteína p16 favoreceu positivamente os nossos resultados, pois os óbitos aumentaram com a diminuição da expressividade da proteína p16 ou com a sua ausência na orofaringe. Portanto, a proteína p16 positiva evidenciou ser mais protetora, com o índice inferior a 1 unidade, em relação a óbitos, valor de  $p = 0,552$  não significativo, porém compatível com os resultados de Stephen et al. (2013).

Na análise das proteínas associadas ou individuais com a localização, observamos um maior número de pacientes com a proteína p53 positiva e a proteína p16 negativa, com 31 casos, sendo 17 (54,8%) casos na orofaringe, 12 (38,7%) casos na hipofaringe e 2 (6,5%) casos na nasofaringe. A segunda frequência foi de pacientes com ambas proteínas negativas, com 21 (72,4%) casos na orofaringe e 8 (27,6%) casos na hipofaringe. A seguir foram os pacientes com as proteínas p53 e p16 positivas, com 16 (76,2%) casos na orofaringe e 5 (23,8%) casos na hipofaringe. E, finalmente, 10 casos de pacientes com somente a proteína p16 positiva, com 9 (90%) casos na orofaringe e apenas 1 (10%) na hipofaringe. Não houve correlação entre as situação das proteínas e a região acometida na faringe.

Todos os pacientes encontravam-se em estágio avançado, com destaque para a proteína p53 positiva isolada com maior número de pacientes, com 27 (87,1%) casos, e o menor número de casos com somente a proteína p16 positiva, com 7 (70%) casos, sem significado estatístico ( $p = 0,422$ ). Houve uma identificação maior da presença da proteína p16 nos tumores iniciais. Entretanto, o maior número de tumores T2 encontrava-se na ausência das proteínas p53 e p16, em 13 (44,8%) casos. Nos tumores mais avançados a proteína p53 foi mais presente. Na avaliação geral do tamanho dos tumores não houve diferenças significativas entre os tumores iniciais ou avançados com a expressividade das proteínas ( $p = 0,152$ ).

No comprometimento linfonodal ocorreu um maior número de casos de disseminação linfonodal em proporção percentual com ambas proteínas positivas e, a seguir, com as duas proteínas negativas. Porém, sem relevância estatística, se comparado aos casos com a presença da proteína p53 ou a proteína p16 isoladas ( $p = 0,706$ ). De forma semelhante ocorreu em relação às características do linfonodo (N), no qual o maior número de N2b foi na ausência das proteínas, porém sem significado estatístico ( $p = 0,656$ ).

Os pacientes com somente a proteína p16 positiva mostraram o menor número de recidiva, comparado a demais situações das proteínas, cujo valor de  $p = 0,06$  (quase significativo). O maior nível de recidiva aconteceu nos pacientes com ausência das proteínas, seguido por pacientes com ambas proteínas positivas e pacientes com somente a proteína p53 positiva. Resultados compatíveis com o estudo de Geisler et al. (2002), Ang et al. (2010), Stephen et al. (2013) e Rasmussen et al. (2017).

O menor número de óbitos geral e pela doença aconteceu nos pacientes com somente a proteína p16 positiva. Porém, houve diferenças entre o percentual de óbitos geral, onde a proporção foi maior nos pacientes com ausência das proteínas, seguido pelos pacientes com ambas proteínas positivas e os pacientes com somente a proteína p53 positiva, respectivamente, sem diferença estatística. Teste de Log-rank= 0,319. Nos óbitos pela doença houve pequenas diferenças entre as proteínas, havendo um leve acréscimo para ambas proteínas positivas em relação à ausência das mesmas, sem significado nas curvas de sobrevida. Teste de Log-rank= 0,470.

Nossos resultados mostram compatibilidade com os achados de Shinohara et al. (2014): a melhor sobrevida foi nos pacientes com somente a proteína p16 positiva, seguida por pacientes com a proteína p53 positiva isolada. Entretanto, encontramos resultados diferentes do Shinohara et al. (2014), pois nossos pacientes com a associação positiva de ambas proteínas, p53 e p16, mostrou a pior curva de sobrevida comparada aos pacientes com as duas proteínas negativas, nos óbitos pela doença.

Nossos resultados confirmam a presença isolada da proteína p16 como protetora, no carcinoma de células escamosas na faringe, particularmente na orofaringe. A ausência da proteína p16 ou a sua baixa expressividade associada ou não à proteína p53 pode comprometer os resultados, como bem documentado por vários autores (Namazie et al., 2002; Von Knebel, 2002; Weinberger et al., 2006; Worsham et al., 2006; Reimers et al., 2007; Psyrri e DiMaio 2008; Lassen et al., 2009; Nasman et al., 2009; Settle et al., 2009b; Ang et al., 2010; Marur et al., 2010; Nguyen



et al., 2010; Schrank et al., 2011; Laco et al., 2012; Silva et al., 2012; Cerezo et al., 2013; Broglie et al., 2013; Stephen et al., 2012; Stephen et al., 2013; Deng et al., 2014, Shinohara et al., 2014).

Na hipofaringe tivemos apenas 1 (10%) caso com somente a proteína p16 positiva. O paciente encontra-se vivo e sem doença até a última consulta em 2018. É muito baixa a expressividade da proteína p16 na hipofaringe, como já relatado por Ernoux-Neufcoeur et al. (2011), Wendt et al. (2014) e Lee et al. (2018).

A análise das proteínas p53 e p16 nos pacientes com carcinoma de células escamosas na faringe mostrou aspectos interessantes, tais como os descritos a seguir. A proteína p53 estava presente na maioria dos pacientes, com 57,1% dos casos, e com o maior nível de expressão o nível C, em 35,2% dos casos. Esteve presente em todas as regiões, como a orofaringe, hipofaringe e a nasofaringe, com proporções discretamente maiores nos subsítios como amígdala, base de língua, palato mole e parede posterior, porém sem importância estatística.

A expressividade da proteína p53 foi mais intensa nos pacientes com maior estadiamento. Identificamos uma doença mais agressiva representada por tumores T3 e T4 associado a um maior comprometimento linfonodal, sem diferença estatística com os pacientes com proteína p53 negativa. Esses últimos pacientes também mostraram certo comprometimento linfonodal, porém com maior frequência de tumores T1 e T2.

O interessante é que a expressividade da proteína p53 não mostrou aumento de recidivas. Os pacientes com a proteína p53 negativa tiveram um maior número de casos de segundo tumor primário na área da cabeça e pescoço. Com a ausência da proteína p53, a ação supressora tumoral ou reguladora do ciclo celular é inexistente para eliminar as células anômalas nos tumores da faringe, conforme mencionado por Gao e Zelenka (1997), Weinert (1998), Parise Jr. et al. (2004), Sathyamurthy et al. (2016) e Rasmussen et al. (2017).

Os óbitos em geral foram consideráveis para ambos os pacientes com a proteína p53 positiva e p53 negativa. Destaca-se o aumento da mortalidade entre os pacientes com a proteína p53 positiva quando ocorre aumento da sua expressão. Nos óbitos pela doença acentuou um pouco mais a proporção com a proteína p53 positiva, contudo sem relevância estatística. Na faringe, a probabilidade de óbito foi um pouco mais que 1 (uma) unidade para os pacientes com a proteína p53 positiva. Diminuiu o risco de óbito com a positividade da proteína, porém não o eliminou completamente.

Esse dado pode corresponder a um menor número de deleções ou anormalidades nos exóons do gene P53. Essas mudanças, ao se reproduzirem na proteína p53, preservam as funções regulatórias no ciclo celular (Shinohara et al., 2014).

Outro aspecto a salientar é a presença concomitante da proteína p16 com a proteína p53. Em diferentes graus de expressividade, a proteína p16 pode alterar a proliferação celular e/ou regulação do ciclo celular, conforme características próprias moleculares. A presença da proteína p16 mostrou um perfil favorável: maior número de tumores iniciais (T1), menor frequência de recidivas e de óbitos, cujo índice de probabilidade para óbitos foi menor que 1 (um).

A presença simultânea da proteína p16 com a proteína p53 parece interferir na proliferação celular, bloqueando o ponto G1-S, diminuindo, assim, os efeitos desfavoráveis da hiper expressividade da proteína p53. Ambas proteínas p53 e p16 são reguladoras do ciclo celular e são produtos de eventos internos nos locos primários dos seus genes. Portanto, podem conter diversas mutações já descritas como a hipermetilação, perda de heterozigose, deleções, entre outras, modificando as suas funções no controle celular. Desse modo, o aumento da expressão da proteína p16 (grau 2 e grau 3) atua favoravelmente, enquanto o menor grau da expressividade (grau 1) gera o mesmo valor negativo da sua ausência, na sobrevida. Nossos resultados encontram concordância com autores como Yuen et al. (2002), Reimers et al. (2007), Schrank et al. (2011), Ang et al. (2010), Stephen et al. (2012), Stephen et al. (2013), Boglie et al. (2013), Shinohara et al., (2014) e Karpathiou et al. (2016).

No estudo dos três sítios (cavidade oral, laringe e faringe) sobre a relação das proteínas p53 e p16 com o carcinoma de células escamosas, identificamos uma maior expressividade da proteína p 53. A expressão intensificava-se à medida que avançava o estadiamento, especialmente nos tumores primários (T), de todas as localizações. A proteína p53 não teve influência direta na disseminação linfonodal.

Na avaliação da recidiva, houve maior percentual de recidivas nos tumores da cavidade oral e da laringe, com pacientes com proteína p53 positiva, embora sem significado estatístico. Na faringe houve um número importante de recidivas com os pacientes com a proteína p53 negativa, além de ocorrer também em pacientes com a proteína p53 positiva. Porém, a recidiva foi mais importante em regiões e subsítios que não pertenciam à orofaringe nos pacientes com a proteína p53 positiva, compatível com o estudo de Rasmussen et al. (2017).

Na faringe, a proteína p53 mostrou-se menos prejudicial à sobrevida dos pacientes. Apesar disso, ainda houve maior número de óbitos pela doença à medida que aumentava a expressividade da proteína p53. Nos tumores da cavidade oral e da laringe desenvolveu-se a mesma situação em relação à proteína p53. Dessa forma, o papel da proteína p53 parece ser de “risco” nos carcinomas de células escamosas da cavidade oral, laringe e faringe (Geisler et al., 2005; Shinohara et al., 2014).

A proteína p16 foi identificada mais intensamente na orofaringe, seguida pela cavidade oral, laringe e hipofaringe, compatíveis com os trabalhos de Hernandez et al. (2016) e Karpathiou et al. (2016). Na cavidade oral, ressaltamos o significado estatístico da sua ausência na língua e/ou soalho oral (Bova et al., 1999; Yuen et al., 2002; Laco et al., 2012; Britto, Paula e Saddi. 2014). Encontramos mais proteína p16 nos subsítios proximais à orofaringe, como a área retro molar na cavidade oral e a supra glote na laringe, sem relevância estatística, porém compatível com o estudo multi-institucional de Castellsagué et al. (2016).

A presença da proteína p16 não interferiu no estadiamento, porém estava presente significativamente nos tumores iniciais (T1), principalmente na orofaringe ( $p = 0.04$ ) (Karpathiou et al., 2016). Não houve relação direta com a disseminação linfonodal ( $p = 0,609$ ). Da mesma forma ocorreu no linfonodo (N), onde não teve relevância estatística ( $p = 0,574$ ). A maior disseminação linfonodal ocorreu nos pacientes com a proteína p16 negativa, sem significado estatístico, especialmente na orofaringe ( $p = 0,609$ ). A disseminação linfonodal foi consequente à rede linfática do sítio primário, à angionese e à invasão angiolinfática dos tumores. A presença das proteínas não parece ter contribuído diretamente com as metástases linfonodais. Todavia, na ausência das mesmas, especialmente, da proteína p16 na faringe, identificou-se um maior número de linfonodos metastáticos (Yuen et al., 2002; Ang et al., 2010; Stephen et al., 2012; Stephen et al., 2013; Britto, Paula e Saddi, 2014).

Na faringe, a ausência das proteínas p53 e p16 contribuíram com o maior número de casos de segundo tumor primário e recidivas, configurando, assim, a importância dessas proteínas como reguladoras e supressores tumorais, principalmente na orofaringe (Parise Jr. et al., 2004; Ang et al., 2010; Broglie et al., 2013; Stephen et al., 2013; Rasmussen et al., 2017).

A taxa de óbitos por doença foi muito maior nos pacientes com a proteína 16 grau 0 ou negativa, em todos os sítios estudados, notadamente na orofaringe e, a seguir, na cavidade oral. Nesses locais a proteína p16 hiper expressa assumiu uma

“função de proteção”, o que não aconteceu com os carcinomas de laringe. Na laringe, a proteína p16 apresentou mais características de risco, possivelmente por mutações genômicas reproduzidas na proteína p16 grau 1, conforme publicações de Silva et al. (2012), entre outros (Bova et al., 1999; Geisler et al., 2002; Yuen et al., 2002 e Hernandez et al., 2016).

A proteína p16 identificada por exame de imunohistoquímica é o primeiro marcador efetivo para detectarmos a correspondência com o HPV-16 (Karpithiou et al., 2016). Como mencionado anteriormente, os pacientes com a proteína p16 positiva, especialmente os tumores de orofaringe, respondem melhor ao tratamento radioterápico associado à quimioterapia, conforme Farkhry et al. (2017). Contudo, boa parte dos nossos pacientes tinham tumores T1 e T2, com a proteína p16 mais expressa em T1, e foram tratados principalmente por cirurgia com adjuvância ou radioterapia pós-operatória (Karpithiou et al., 2016).

Observamos que dependendo do grau e da proporção presente da proteína p16 com a proteína p53 parece haver uma diminuição do número de óbitos no carcinoma da cavidade oral e da faringe, mais amiúde na orofaringe. Na laringe não tivemos claro esse papel. Pelo contrário, houve maior probabilidade de óbitos, provavelmente pela própria situação da proteína ter menos função sobre a proliferação celular. Apesar da nossa limitação em não identificar o vírus HPV-16 e as alterações genéticas das proteínas, observamos uma melhor sobrevida com a presença da proteína p16 na orofaringe e na cavidade oral (Yuen et al., 2002; Stephen et al., 2013).

Outro fato importante é o sítio primário da neoplasia. Esse mostrou ser relevante tanto na ausência como na expressividade das proteínas p53 e p16, associadas ou isoladas. Todas as curvas de sobrevida dos pacientes com carcinomas dos três sítios não evidenciaram significado estatístico, porém houve diferenças pontuais dependentes do local de origem da neoplasia. Assim, na cavidade oral, em ordem decrescente, a positividade isolada da proteína p16 mostrou melhor sobrevida, seguida pela ausência das proteínas, expressividade positiva das proteínas p53 e p16, e a pior sobrevida ficou com a proteína p53 positiva isolada. Na laringe a melhor sobrevida foi na ausência das proteínas, seguida pela proteína p16 positiva, positividade simultânea das proteínas, e a pior sobrevida com a proteína p53 positiva isolada. Na faringe constatamos semelhanças com o trabalho de Shinohara et al. (2014), com exceção na associação das proteínas, onde tivemos pior sobrevida com

ambas proteínas positivas, seguida pela expressividade negativa das proteínas p53 e p16 concomitantes. A melhor sobrevida foi obtida com os pacientes com somente a proteína p16 positiva, e a segunda melhor sobrevida com os pacientes com a proteína p53 positiva.

Com esses resultados podemos definir que a presença e o aumento da expressividade da proteína p53 expõe a uma doença mais grave no local de origem, principalmente na cavidade oral e na laringe. Na faringe, a proteína p53 parece ter um papel mais favorável à sobrevida.

A proteína p16 teve a sua maior expressividade na orofaringe, e menor na língua e/ou soalho oral, laringe e na hipofaringe. Quando presente sugere uma melhor evolução, tanto na cavidade oral como na orofaringe. Na laringe não parece influenciar os resultados, que concordam com os trabalhos de Yuen et al. (2002), Begun et al. (2003), Ang et al. (2010), Silva et al. (2012) e Hernandez et al. (2016).

A ausência concomitante das proteínas foi melhor na laringe e na cavidade oral, e desfavorável na faringe, conforme documentado por Ang et al. (2010), Stephen et al. (2013), Shinohara et al. (2014) e Karpathiou et al. (2016), entre outros.

O exame de imunohistoquímica mostrou-se efetivo, específico e seguro na expressividade das proteínas p53 e p16, relacionando-as com os parâmetros pré-determinados (Karpathiou et al., 2016).

E, finalmente, para a melhor compreensão do papel das proteínas p53 e p16, é necessário ampliar o seu estudo através do sequenciamento genético das mesmas e, assim, identificar as principais mutações desfavoráveis à evolução da doença. A relevância das proteínas parece relacionada ao local de origem do tumor, assim como a sua ausência ou presença em diferentes níveis de expressividade traduz diferentes respostas ao tratamento e à sobrevida. Em algum momento da “homeostase celular” poderá haver uma desregulação do ciclo celular, promovendo meios para o desenvolvimento de uma neoplasia. Logo, é fundamental avaliar as circunstâncias presentes nesse processo de desregulação celular por meio da expressividade ou estudo genômico das proteínas a fim de adequar o melhor tratamento com menos morbimortalidade, além de ampliar o tempo livre de doença e a sobrevida (Britto, Paula e Saddi, 2014; Perri et al., 2015; Ottria et al., 2018; Solomon, Young e Rischin, 2018).

## **6. Conclusões**

---

## 6 CONCLUSÕES

No estudo da expressividade das proteínas p53 e p16 no carcinoma de células escamosas da cavidade oral, laringe e faringe, concluímos:

- As proteínas p53 e p16 têm diferentes implicações no desenvolvimento do carcinoma de células escamosas da cavidade oral, laringe e da faringe.

- A relevância da expressividade das proteínas p53 e p16 como marcadores está relacionado com o sítio de origem do carcinoma.

- A proteína p53 é mais expressa no carcinoma de células escamosas da cavidade oral, laringe e faringe, demonstrando a sua importância desde o início da carcinogênese no local primário da neoplasia até o desenvolvimento de tumores (T) mais avançados, sem influenciar na disseminação linfonodal.

- A proteína p53 é risco para a sobrevida dos pacientes com carcinoma de células escamosas na cavidade oral e laringe, principalmente em níveis altos de sua expressividade, e em menor intensidade na faringe.

- A proteína p16 é mais expressa na orofaringe, seguida da cavidade oral e menos frequente na laringe e hipofaringe.

- A proteína p16, quando presente, é identificada já nos carcinomas iniciais da orofaringe. Ela tem baixíssima expressividade na língua/soalho oral, entretanto pode estar mais frequente nos sítios proximais à orofaringe, como a área retro molar e a supra glote. Não demonstra relação direta com a disseminação linfonodal, porém especialmente na orofaringe, a sua ausência ou baixa expressividade sugere um maior comprometimento de metástases linfonodais.

- A proteína p16 é mais protetora na sobrevida dos pacientes com carcinoma de células escamosas da cavidade oral e da orofaringe à medida que aumenta a sua expressividade, sendo que essa situação não se reproduz na laringe e na hipofaringe.

- A presença simultânea das proteínas p53 e p16 parece influenciar em diferentes momentos a sobrevida dos pacientes, de acordo com o sítio primário da neoplasia e o grau de expressividade das proteínas, associadas ou não a diferentes mutações.

- Os graus variados de expressividade das proteínas determinaram o padrão de risco e proteção na sobrevida dos pacientes.

## ***7. Referências***

---



## 7 REFERÊNCIAS

- Abrahão AC, Bonelli BV, Nunes FD, et al. [Immunohistochemical expression of p53, p16, and hTERT in oral squamous cell carcinoma and potentially malignant disorders]. *Braz Oral Res.* 2011; Jan- Feb. 25(1):34-41. Portuguese.
- Almangush A, Heikkinen I, Mäkitie AA, et al. Prognostic biomarkers for oral tongue squamous cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Br J Cancer.* 2017; Sep 5;117(6):856-66.
- Alvarenga LM, Ruiz MT, Pavarino-Bertelli EC, et al. [Epidemiologic evaluation of head and neck patients in a university hospital of Northwestern São Paulo State]. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2008;74(1):68-73. Portuguese.
- Ang Kian K, Harris J, Wheeler R, et al. Human Papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N. Engl. J Med.* 2010; 363: 24-35.
- Begun S, Gillison ML, Ansari-Lari MA, et al. Detection of human papillomavirus in cervical lymph nodes: a highly effective strategy for localizing site of tumor origin. *Clin Cancer Res.* 2003;Dec.15;9(17):6469-75.
- Binato M. Expressividade Imunohistoquímica das proteínas p53 e Ki-67 no epitélio esofágico de pacientes com doença do refluxo gastroesofágico, esôfago de barret e adenocarcinoma [tese]. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2007.
- Bloching MM, Soulsby H, Naumann A, et al. Tumor risk assessment by means of immunocytochemical detection of early pre-malignant changes in buccal smears. *Oncology Reports.* 2008; 19:373-9.
- Britto NMS, Paula HSC, Saddi VA. [The role of p16 and Ki 67 in squamous cell carcinomas of the oral cavity and oropharynx]. *Rev. Bras. de Cir. Cabeça e Pescoço* 2014; Out-Dez. 43(40): 200-5. Portuguese.
- Broglie MA, Soltermann A, Rohrbach D, et al. Impact of p16, p53, smoking, and alcohol on survival in patients with oropharyngeal squamous cell carcinoma treated with primary intensity-modulated chemoradiation. *Head Neck.*2013;Dec.35(12):1698-706.
- Bova RJ, Quinn DI, Nankervis JS, et al. Cyclin D1 and p16INK4A expression predict reduced survival in carcinoma of the anterior Tongue. *Clin Cancer Res.*1999;5:2810-19.
- Castellsagué X, Alemany L, Quer M, et al. HPV Involvement in head and neck cancers: comprehensive assessment of biomarkers in 3680 patients. *JNCI J Natl Cancer Inst* 2016; Jan 108 (6):1-12.

Cerezo L, López C, La Torre A, et al. Incidence of human papillomavirus-related oropharyngeal cancer and outcomes after chemoradiation in a population of heavy smokers. *Head Neck* 2013; Apr.36: 782-6.

Chen PH, Huang B, Shieh TY, et al. The influence of monoamine oxidase variants on the risk of betel quid-associated oral and pharyngeal cancer. *Scientific World Journal*. 2014;1835-48.

Chernock RD, Zhang Q, El-Mofty SK, et al. Human papillomavirus-related squamous cell carcinoma of the oropharynx: a comparative study in whites and african americans. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2011; 137(2):163-9.

Colombo J, Rahal P. [Genetic changes in head and neck cancer]. *Revista Brasileira de Cancerologia*. 2009;55(2):165-74. Portuguese.

Deng Z, Hasegawa M, Aoki K, et al. A comprehensive evaluation of human papillomavirus positive status and p16<sup>INK 4a</sup> overexpression as a prognostic biomarker in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Oncol*. 2014; Jul.45(1): 67-76.

Edge SB, Byrd DR, Carducci MA, et al, eds. American Joint Committee on Cancer (AJCC) Cancer Staging Handbook. 7th ed. New York: Springer; 2010.

Ernoux-Neufcoeur P, Arafa M, Decaestecker C et al. Combined analysis of HPV DNA, p16, p21 and p53 to predict prognosis in patients with stage IV hypopharyngeal carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2011; Jan. 137(1):173–81.

Fakhry C, Westra WH, Li S, et al. Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *J Natl Cancer Inst*. 2008;100(4):261-9.

Fakhry C, Westra WH, Wang SJ, et al. The prognostic role of sex, race, and human papillomavirus in oropharyngeal and nonoropharyngeal head and neck squamous cell cancer. *Cancer*. 2017; May 1;123(9):1566-75.

Ferreira CG, Rocha JC. *Oncologia Molecular*. 2ª ed. São Paulo: Editora Atheneu; 2010, Portuguese.

Fett-Conte AC, Salles ABC. [The importance of the gene p53 in human carcinogenesis]. *Rev.bras.hematol.hemoter*. 2002;24(2):85-9. Portuguese.

Friedman M, Lim JW, Manders E, et al. Prognostic significance of Bcl-2 and p53 expression in advance laryngeal squamous carcinoma. *Head Neck*. 2001; Apr.23(4):280-5.

Galgano ML, Castle FE, Atkins KA, et al. Using Biomarkers as Objective Standards in the Diagnosis of Cervical Biopsies. *Am J Surg Pathol*. 2010; August; 34 (8):1077-87.

Galli P, Cadoni G, Volante M, et al. A case-control study on the combined effects of *p53* and *p73* polymorphisms on head and neck cancer risk in an Italian population *BMC Cancer*. 2009;May.9(137):1-9.

Gao CY, Zelenka PS. Cyclins, cyclinsdependent kinasis and differentiation. *BioEssazys*, 1997 19: 307-15.

Geisler AS, Olshan AF, Weissler MC, et al. p16 and p53 protein expression as prognostic indicators of survival and disease recurrence from head and neck cancer. *Clinical Cancer Res*. 2002; Nov. 8: 3445–53.

Goldenberg D, Golz A, Joachims HZ. The beverage maté: a risk factor for cancer of the head and neck. *Head Neck*. 2003 Jul;25(7):595-601.

Hernandez BY, Rahman M, Lynch CF, et al. The HPV typing of cancer workgroup. p16 (INK4A) expression in invasive laryngeal cancer. *Papillomavirus Research*. 2016; 2 52–5.

Hirvikoski P, Kumpulainen E, Virtaniemi J, et al. p53 expression and cell proliferation as prognostic factors in laryngeal squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol* 1997; 15: 3111-20.

Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Rio de Janeiro: INCA 2018. Estimativa 2018. Incidência de Câncer no Brasil.[Internet]. Available from:<http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/introducao.asp>.

Isayeva T, Li Yufeng, Maswahu D. Human papillmavirus in non-oropharyngeal head and neck cancers: A systematic literature review. *Head and Neck Pathol*. 2012; Jul.6(1):104–20.

Jackel CM, Sellmann LM, Dorudian AM et al. Prognostic significance of p53/bcl-2 co-expression in patients with laryngeal squamous cell carcinoma. *Laryngoscope*.2000;Aug.110:1339-45.

Jin YT, Kayser S, Kemp BL, et al. The prognostic significance of the biomarkers p21WAF1/CIP1, p53, and bcl-2 in laryngeal squamous cell carcinoma. *Cancer*. 1998;Jun.(11):2159-65.

Karpathiou G, Monaya A, Forest F, et al. p16 and p53 expression status in head and neck squamous cell carcinoma: a correlation with histological, histoprognostic and clinical parameters. *Pathology*.2016;Jun.48(4):341-8.

Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, et al. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005;14(2):467-75.

Kumar BM, Cordell GK, D'Silva NB, et al. Expression of p53 and Bcl-XI as predictive markers for larynx preservation in advanced laryngeal cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2008;Apr.134(4):363-9.

Lane DP, Crawford LV. T-antigen is bound to host protein in SV40-transformed cells. *Nature*. 1979;278:261-3.

Lee JK, Lee K-H, Kim S-A, et al. p16 as a prognostic factor for the response to induction chemotherapy in advanced hypopharyngeal squamous cell carcinoma. *Oncology Letters*. 2018;15:6571-7.

Levine AJ. P53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*. 1997;88:323-31.

Laco J, Nekvindova J, Novakova V, et al. Biologic importance and prognostic significance of selected clinicopathological parameters in patients with oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma, with emphasis on smoking, protein p16(INK4a) expression, and HPV status. *Neoplasma*. 2012;59(4):398-408.

Lassen P, Eriksen JG, Hamilton-Dutoit S, et al. Effect of HPV – associated p16INK4A expression on response to radiotherapy and survival in squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Oncol*. 2009;27(12):1992-8.

Luken MMJ, Conde MC, Carnero A. A genetic view of laryngeal cancer heterogeneity. *Cell Cycle*. 2016;15(9):1202-12.

Marur S, D'Souza G, Westra WH, et al. HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. *Lancet Oncol*. 2010; Aug.11(8):781-9.

Mondal D, Saha K, Datta C, et al. Ki67, p27 and p53 Expression in Squamous Epithelial lesions of Larynx. *Indian J Otolaryngol Head and Neck Surg*. 2013;65(2):126-33.

Nadal A, Campo E, Pinto J, et al. p53 expression in normal, dysplastic, and neoplastic laryngeal epithelium. Absence of a correlation with prognostic factors. *J Pathol*. 1995;175:181-8.

Namazie A, Alavi S, Olopade OI, et al. Cyclin D1 amplification and p16 (NTS1/CDK41) deletion correlate with poor prognosis in head and neck tumors. *Laryngoscope*. 2002;112(3):472-81.

Näsman A, Attner P, Hammarstedt L, et al. Incidence of human papillomavirus (HPV) positive tonsillar carcinoma in Stockholm, Sweden: an epidemic of viral-induced carcinoma? *Int J Cancer*. 2009;Jul.125(2):362-6.

Nguyen NP, Chi A, Nguyen LM, et al. Human papillomavirus-associated oropharyngeal cancer: a new clinical entity. *QJM*. 2010; Apr.103(4):229-36.

Ottaria L, Candotto V, Cura F, et al. HPV acting on E-cadherin, p53 and p16: literature review. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2018;Jan-Feb.32(2 Suppl. 1):73-9.

Parise Jr. et al. [Prognostic impact of p53, c-erb-2 and epidermal growth factor receptor on head and neck carcinoma]. *São Paulo Medical Journal*. 2004;122(6):264-68. Portuguese.

- Patel KR, Vajaria BN, Singh RD, et al. [Clinical Implications of p53 alterations in oral cancer progression: a review from India]. *Experimental Oncology*. 2018; Mar.40:10-18. Indian.
- Perdomo S, Roa G M, Brennan P, et al. Head and neck cancer burden and preventive measures in Central and South America. *Cancer Epidemiology*. 2016;44s:543-52.
- Perri F, Pacelli R, Scarpato GDV, et al. Radioresistance in head and neck squamous cell carcinoma: Biological bases and therapeutic implications. *Head Neck*. 2015; May.37(5):763-70.
- Pruner G, Pignataro L, Carboni N Clinical relevance of p53 and bcl-2 protein over-expression in laryngeal squamous-cell carcinoma. *Int J Cancer*. 1998; Jun.19;79(3):263-8.
- Pukkila MJ, Kumpulainen EJ, Virtaniemi JA, et al. Nuclear and cytoplasmic p53 expression in pharyngeal squamous cell carcinoma: prognostic implications. *Head Neck*. 2002; Aug;24(8):784-91.
- Psyrr A, DiMaio D. Human papillomavirus in cervical and head-and-neck cancer. *Nat Clin Pract Oncol*. 2008;5(1):24-31.
- Rasmussen GB, Håkansson KE, Vogelius IR, et al. Immunohistochemical and molecular imaging biomarker signature for the prediction of failure site after chemoradiation for head and neck squamous cell carcinoma. *Acta Oncologica*. 2017; 56(11):1562-70.
- Reimers N, Kasper HU, Weissenborn SJ, et al. Combined analysis of HPV-DNA, p16 and EGFR expression to predict prognosis in oropharyngeal cancer. *Int J Cancer*. 2007; Apr.15;120(8):1731–71.
- Rodrigues RB, Motta RR, Machado SMS, et al. Prognostic value of the immunohistochemistry correlation of Ki-67 and p53 in squamous cell carcinomas of the larynx. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*. 2008; Nov/Dec.74(6):855-9.
- Ruiz MT, Pavarino-Bertelli E, Maniglia JV, et al [Head and Neck cancer epidemiology and biomarkers]. *Arq Ciência Saúde*. 2006; Jan-Mar.13(1):34-8. Portuguese.
- Sathyamurthy A, Koushik KAS, Gowri M, et al. Impact of molecular predictors on the response rates in head and neck cancer patients. *Observational Study Indian J Surg Oncol* .2016;Dec.7(4):380–85.
- Sarafoleanu D, Postelnicu V, Iosif C, et al. The role of p53, PCNA and Ki-67 as outcome predictors in the treatment of laryngeal cancer. *Journal of Medicine and Life* 2009; Apr-Jun. 2(2):219-26.
- Schrank TP, Han Y, Weiss H, et al. Case-matching analysis of head and neck squamous cell carcinoma in racial and ethnic minorities in the United States -

possible role for human papillomavirus in survival disparities. *Head Neck*. 2011;Jan.33(1):45-53.

Settle K, Posner MR, Schumaker LM, et al. Racial survival disparity in head and neck cancer results from low prevalence of human papillomavirus infection in black oropharyngeal cancer patients. *Cancer Prev Res*. 2009a; 2(9):776-81.

Settle K, Taylor R, Wolf J, Kwok Y, et al. Race impacts outcome in stage III/IV squamous cell carcinoma of head and neck after concurrent chemoradiation therapy. *Cancer*. 2009b;115(8):1744-52.

Simsek H, Han U, Onal B, et al. The expression of EGFR, cerbB2, p16, and p53 and their relationship with conventional parameters in squamous cell carcinoma of the larynx. *Turk J Med Sci*. 2014;(44):411-16.

Silva SD, Nonogaki S, Soares FA, et al. p16 (INK4a) has clinicopathological and prognostic impact on oropharynx and larynx squamous cell carcinoma. *Braz J Med Biol Res*. 2012;Dec.45(12):1327-33.

Singla S, Singla G, Rawat DS, et al. Expression of p53, epidermal growth factor receptor, c-erbB2 in oral leukoplakias and oral squamous cell carcinomas. *J Can Res. and Ther*. 2018;Jan-Mar.14(2):388-93.

Shinohara S, Kikuchi M, Tona R, et al. Prognostic impact of p16 and p53 expression in oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Jpn J Clin Oncol*. 2014;44(3):232-40.

Smeets SJ, Hesselink AT, Speel EJ, et al. A novel algorithm for reliable detection of human papillomavirus in paraffin embedded head and neck cancer specimen. *Int J Cancer*. 2007;121(11):2465-72.

Smith EM, Rubenstein LM, Hoffman H, et al. Human papillomavirus, p16 and p53 expression associated with survival of head and neck cancer. *Infect Agent Cancer*. 2010;5(4):1-10.

Syrjänen K, Syrjänen S, Lamberg M, et al. Morphological and immunohistochemical evidence suggesting human papillomavirus (HPV) involvement in oral squamous cell carcinogenesis. *Int J Oral Surg*. 1983;Dec12(6):418-24.

Spafford MF, Koeppe J, Pan Z, et al. Correlation of tumour markers p53, bcl-2, CD34, CD44H, CD44v6, and Ki-67 with survival and metastasis in laryngeal squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1996;122:627-32.

Solomon B, Young RJ, Rischin D. Head and neck squamous cell carcinoma: Genomics and emerging biomarkers for immunomodulatory cancer treatments. *Semin Cancer Biol*. 2018;Jan.3(17):30256-60.

Stephen JK, Chen KM, Shah V, et al. Human Papillomavirus Outcomes in an Access-to-Care Laryngeal Cancer Cohort. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2012;146(5):730-8.

Stephen JK, Divine G, Chen KM, et al. Significance of p16 in site-specific HPV Positive and HPV Negative Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Clin Oncol*. 2013;2(1):51-61.

Tandon S, Tudur-Smith C, Riley RD, et al. A Systematic Review of p53 as a prognostic factor of survival in squamous cell carcinoma of the four main anatomical subsites of the head and neck. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2010;Feb.19(2):574–87.

Von Knebel DM. New markers for cervical dysplasia to visualize the genomic chaos created by aberrant oncogenic papillomavirus infections. *Eur J Cancer*. 2002;38(17):2229-42.

Wang LD, Hong JY, Qiu SL, et al. Accumulation of p53 Protein in human esophageal precancerous lesions: a possible early biomarker for carcinogenesis. *Cancer Res*. 1993; Apr.53:1783-87.

Wang Z, Sturgis EM, Zhang Y, et al. Combined p53-related genetic variants together with HPV infection increase oral cancer risk. *Int J Cancer*. 2012;Aug1;131(3):E251-8.

Wang Z, Xia R-H, Ye D-X, et al. Human Papillomavirus 16 Infection and *TP53* mutation: two distinct pathogeneses for oropharyngeal squamous cell carcinoma in an eastern chinese population. *Plos One*. 2016;Oct.17:1-17.

Weinberger PM, Yu Z, Haffty BG, et al. Molecular classification identifies a subset of human papillomavirus--associated oropharyngeal cancers with favorable prognosis. *J Clin Oncol*. 2006;Feb.10;24(5):736-4.

Weinberger PM, Merkley MA, Khichi SS, et al. Human papillomavirus –active head and neck cancer and ethnic health disparities. *Laryngoscope*. 2010;120(8):1531-37.

Weinert T. DNA damage and checkpoint pathways: molecular anatomy and interactions with repair. *Cel*.1998;94:555-58.

Wendt M, Romanitan M, Nasman A, et al. Presence of human papillomaviruses and p16 in hypopharyngeal cancer. *Head Neck* 2014; Jan36(1):107-12.

Wittekindt C, Wagner S, Mayer CS, et al. Basics of tumor development and importance of human papiloma virus (HPV) for head and neck cancer. *Curr Top Otorhinolaryngol Head Neck Surg*. 2012; Dec20;(11):1-29.

Worsham MJ, Chen KM, Tiwari N, et al. Fine–mapping loss of gene architecture at the CDKN2B(p15INK4b), CDKN2A(p14ARF,p16INK4a) and MTAP genes in head and neck squamous cell carcinoma *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2006;132(4):409-415.

Yang JQ, Liu HX, Liang Z, et al. Over expression of p53, p21 and Cdc2 in histologically negative surgical margins is correlated with local recurrence of laryngeal squamous cell carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014;7(7):4295-4302.

Yuen PW, Man M, Lam KY, et al. Clinicopathological significance of p16 gene expression. In the surgical treatment of head and neck squamous cell carcinomas. J Clin Pathol. 2002;55:58–60.

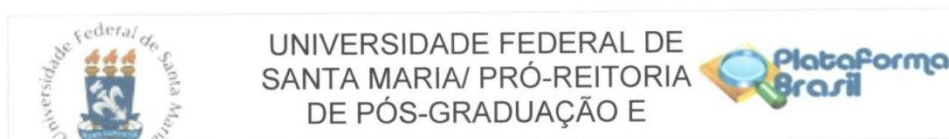
Zaid K, Azar-Maalouf E, Barakat C, et al. p53 Overexpression in Oral Mucosa in Relation to Shisha Smoking in Syria and Lebanon Asian Pac J Cancer Prev. 2018; Mar19;(7):1879-82.



## ***8. Anexos***

---

## Anexo 1 – Parecer do Conselho de Pesquisa e Extensão - UFSM



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Expressividade do P53 e do P16 em pacientes com carcinoma de células escamosas de boca, laringe e faringe nas disseminação linfonodal.

**Pesquisador:** Maria da Graça Caminha Vidal

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 44642915.6.0000.5346

**Instituição Proponente:** Universidade Federal de Santa Maria/ Pró-Reitoria de Pós-Graduação e

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 1.103.486

**Data da Relatoria:** 03/06/2015

#### Apresentação do Projeto:

O presente estudo tem como o objetivo analisar a frequência da imuno expressividade do gene P53 e da proteína P16 nos pacientes portadores de carcinoma epidermóide na cavidade oral, laringe e faringe, diagnosticados e tratados no Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do HUSM, no período de 2015 a 2018.

É notória a importância da expressividade do P53 em pacientes com carcinoma de células escamosas de via aérea superior relacionados, a fatores de risco como o tabagismo e as características de invasão local. Porém há controvérsia na literatura, quanto a sua relação direta com a disseminação linfonodal. As mutações no gene TP53 ocorrem em 40% a 60% dos pacientes com CEC em via aéreo-digestivo superior; associado a um pior prognóstico pelo avanço da doença, diminuindo o tempo de sobrevida. Em relação, ao P16 há estudos recentes que mencionam pacientes com sua expressividade positiva à maior disseminação linfática; porém com uma resposta favorável ao tratamento com radioterapia e quimioterapia. Atualmente, o perfil do paciente com CEC em via aéreo-superior digestiva tem a expressividade citogenética variada e mais complexa tanto relacionados com genes supressores como P53, como os oncogenes relacionados à infecção por HPV (P16); apresentando quadros de comportamentos biológicos

**Endereço:** Av. Roraima, 1000 - prédio da Reitoria - 2º andar

**Bairro:** Camobi

**CEP:** 97.105-970

**UF:** RS

**Município:** SANTA MARIA

**Telefone:** (55)3220-9362

**E-mail:** cep.ufsm@gmail.com



UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SANTA MARIA/ PRÓ-REITORIA  
DE PÓS-GRADUAÇÃO E



Continuação do Parecer: 1.103.486

diferentes, independentes dos estádios oncológicos.

Esse estudo visa verificar a expressividade do P53 e do P16 nos carcinomas epidermóides diagnosticados e tratados nos pacientes do Hospital Universitário de Santa Maria-RS e sua relação direta com a disseminação local e regional da doença e o tempo livre de doença.

A maior parte desses pacientes é de origem européia, em decorrência da forte origem italiana e alemã da nossa população no Centro do Rio Grande do Sul. Os objetivos visam verificar o grau de disseminação da doença, em estágio clínico e patológico, com o grau de frequência dos genes P53 e p16 nos CEC desses pacientes, relacionando a fatores de risco e étnicos. E por final relacionar a sua expressividade com o tempo de sobrevida livre de doença nesses pacientes.

**Objetivo da Pesquisa:**

Verificar a existência do aumento da expressividade do gene P53 e da proteína P16 concomitantes ou separados, diagnóstico e no aumento do estadiamento dos pacientes com CEC de boca, laringe e faringe.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Foram avaliados adequadamente.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

O TCLE apresentado não indica o endereço da Instituição/Departamento descrito de maneira completa.

As informações quanto ao local de guarda dos dados ainda não são claras (informar no Termo de Confidencialidade) o prédio e a sala onde os mesmos serão mantidos.

**Recomendações:**

Veja no site do CEP - <http://w3.ufsm.br/nucleodecomites/index.php/cep> - na aba "orientações

**Endereço:** Av. Roraima, 1000 - prédio da Reitoria - 2º andar

**Bairro:** Camobi

**CEP:** 97.105-970

**UF:** RS

**Município:** SANTA MARIA

**Telefone:** (55)3220-9362

**E-mail:** cep.ufsm@gmail.com



UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
SANTA MARIA/ PRÓ-REITORIA  
DE PÓS-GRADUAÇÃO E



Continuação do Parecer: 1.103.486

gerais", modelos e orientações para apresentação dos documentos. Acompanhe as orientações disponíveis, evite pendências e agilize a tramitação do seu projeto.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

No termo de confidencialidade deve-se indicar, com precisão, o prédio e a sala onde os dados serão mantidos. No arquivo anexado essas informações estão indicadas por "xx". É preciso corrigir esta informação.

A aprovação não exige o proponente de fazer a correção indicada e requerida.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

SANTA MARIA, 11 de Junho de 2015

Assinado por:

CLAUDEMIR DE QUADROS  
(Coordenador)

**Endereço:** Av. Roraima, 1000 - prédio da Reitoria - 2º andar

**Bairro:** Camobi

**CEP:** 97.105-970

**UF:** RS

**Município:** SANTA MARIA

**Telefone:** (55)3220-9362

**E-mail:** cep.ufsm@gmail.com

## Anexo 2 – Autorização da Comissão de Ética

1



### AUTORIZAÇÃO INSTITUCIONAL

Eu Dr. Silvio Luis Marcon Ribeiro abaixo assinado, responsável pela Coordenação de Apoio Diagnóstico e Terapêutico em Cirurgia, Chefe do Bloco Cirúrgico do HUSM-UFSM-RS junto a Comissão de Ética, autorizo a realização do estudo **Expressividade do P53 e do P16 em Pacientes com Carcinoma de Células Escamosas de Boca, Laringe e Faringe na Disseminação Linfonodal** projeto a ser conduzido pelos pesquisadores Dra. Maria da Graça Caminha Vidal–Pesquisadora Principal, Dr. Onivaldo Cervantes-Orientador, Dra. Virgínia Coser Co-Orientadora, Dr. Carlos Renato Almeida Melo, Dra. Melissa Falster Daubermann, Dra. Alessandra Saldanha Bastianello e Dr. Aliende Lengler Abentroth. Fui informado, pelo responsável do estudo, sobre as características e objetivos da pesquisa, bem como das atividades que serão realizadas na instituição a qual represento. Esta instituição está ciente de suas responsabilidades como instituição coparticipante do presente projeto de pesquisa e de seu compromisso no resguardo da segurança e bem estar dos sujeitos de pesquisa nela recrutados, dispondo de infraestrutura necessária para a garantia de tal segurança e bem-estar.

Santa Maria 06 de Abril de 2015

A handwritten signature in blue ink, which appears to read "Silvio", is written over a faint, larger version of the same signature.

Dr. Silvio Luis Marcon Ribeiro  
Chefe Div. de Apoio Diag. e Terapêutico  
HUSM - EBSERH  
CREMERS 15.742

Assinatura e carimbo do responsável institucional

### **Anexo 3 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)**

Título do estudo: Expressividade do p53 e do p16 em Pacientes com Carcinoma de Células Escamosas de Boca, Laringe e Faringe na Disseminação Linfonodal

Pesquisador responsável: Dra. Maria da Graça Caminha Vidal  
Instituição/Departamento: Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do HUSM  
Telefone e endereço postal completo: Ex: (55) 3220-0000. Avenida Roraima, 1000, prédio xx, sala xx, 97105-970 - Santa Maria - RS. Local da coleta de dados: Serviço de Patologia da Universidade Federal de Santa Maria e Laboratório Reunidos de Santa Maria

Eu Maria da Graça Caminha Vidal responsável pela pesquisa Expressividade do p53 e do p16 em Pacientes com Carcinoma de Células Escamosas de Boca, Laringe e Faringe na Disseminação Linfonodal o convidamos a participar como voluntário deste nosso estudo.

Esta pesquisa pretende verificar a expressão dos biomarcadores nos tumores de células escamosas. Acreditamos que ela seja importante porque vai esclarecer o desenvolvimento desses tumores na sua apresentação clínica e patológica e a sua resposta ao tratamento proposto. Para sua realização será feito o seguinte: - Coleta de material, ou seja, fragmento de tecido da lesão nas peças de biópsias ou de peças cirúrgicas que será preparado em lâminas cuja coloração das mesmas será para fazer o diagnóstico de tumor: carcinoma de células escamosas e principalmente essas lâminas servirão para a nossa pesquisa da imunohistoquímica. A imunohistoquímica será feita para verificar a positividade dos biomarcadores do p53 e do p16 nos tumores de carcinoma de células escamosas localizados na boca, laringe e faringe. O objetivo principal dessa pesquisa é para verificar a imunoexpressividade positiva desses biomarcadores e se essa positividade tem influência na disseminação de metástases nos linfonodos do pescoço. A importância de saber se há metástases é porque influencia na escolha do tratamento e também pode alterar o prognóstico. A sua participação é autorizar basicamente a pesquisa desses biomarcadores no laboratório de patologia e concordando responder o questionário específico para identificação de fatores de risco, hábitos, a sua etnia além da anamnese (história médica) específica.

===== Comitê de Ética em Pesquisa da UFSM: Av. Roraima, 1000 - 97105-900 - Santa Maria - RS - 2º andar do prédio da Reitoria. Telefone: (55) 3220-9362 - E-mail: cep.ufsm@gmail.

Esse trabalho de pesquisa visa exclusivamente, o estudo da imunohistoquímica apenas do material das peças de biópsias ou das cirúrgicas. Não haverá nenhum método que necessite coletar material de elementos biológicos do corpo como sangue, pele, saliva ou secreções no organismo dos pacientes, através de agulhas, biópsias in vivo ou qualquer outro método invasivo. Os benefícios que esperamos como esses estudos são: Classificar a imunohistoquímica como predictor da disseminação da doença local e regional assim como verificar se essa expressividade influencia a resposta ao tratamento cirúrgico ou a radioterapia e quimioterapia concomitantes ou sequenciais. Não haverá nenhum risco a integridade física, do

paciente se o mesmo autorizar a realização da imunoexpressividade desses biomarcadores. Quanto ao questionário será obtido em caráter sigiloso e privativo em uma sala no ambulatório da cabeça e pescoço na ala II destinada para essa entrevista, na presença somente da pesquisadora principal e do paciente. Não terá o seu nome escrito nesse questionário, apenas uma identificação por um número no mesmo. E as informações serão esclarecidas quanto aos fatores de risco são importantes para identificarmos a sua influência no desenvolvimento da doença, jamais em caráter de repreensão ou cobrança em relação aos hábitos do paciente na sua vida pregressa. A entrevista será feita num ambiente calmo e tranqüilo de forma que o paciente consciente do que e como será questionado, possa se sentir a vontade de participar, após ter autorizado a pesquisa. Durante todo o período da pesquisa você terá a possibilidade de tirar qualquer dúvida ou pedir qualquer outro esclarecimento. Para isso, entre em contato com algum dos pesquisadores ou com o Conselho de Ética em Pesquisa. Você tem garantido a possibilidade de não aceitar participar ou de retirar sua permissão a qualquer momento, sem nenhum tipo de prejuízo pela sua decisão. As informações desta pesquisa serão confidenciais e poderão divulgadas, apenas, em eventos ou publicações, sem a identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre sua participação. Os gastos necessários para a sua participação na pesquisa serão assumidos pela pesquisadora principal: Maria da Graça Vidal

=====

Comitê de Ética em Pesquisa da UFSM: Av. Roraima, 1000 - 97105-900 - Santa Maria - RS - 2º andar do prédio da Reitoria. Telefone: (55) 3220-9362 - E-mail: cep.ufsm@gmail.

Autorização Eu, [nome completo do voluntário], após a leitura ou a escuta da leitura deste documento e ter tido a oportunidade de conversar com o pesquisador responsável, para esclarecer todas as minhas dúvidas, estou suficientemente informado, ficando claro para que minha participação é voluntária e que posso retirar este consentimento a qualquer momento sem penalidades ou perda de qualquer benefício. Estou ciente também dos objetivos da pesquisa, que é verificar a expressão de positividade dos biomarcadores acima citados. A presença desses biomarcadores será verificada através das lâminas com material das lesões que foram retiradas por biópsias. Tenho plena consciência que não haverá nenhum método invasivo como punções, coletas de secreções, saliva, sangue ou biópsias a mais no meu organismo. Também tenho plena consciência que esse questionário será feito de forma sigilosa e privativa e que meu nome não será exposto, apenas uma identificação por meio de um número e que será entre a minha pessoa e a pesquisadora principal em uma sala reservada para esse objetivo no serviço de cirurgia de cabeça e pescoço na ala II do térreo do HUSM. Já me foi esclarecido todos os aspectos em relação a fatores de risco e hábitos não como forma de repreensão ou de cobrança e sim para saber se esses hábitos ou fatores de risco que por ventura fui exposto pode ter tido influência na doença na qual estou sendo tratado. E conforme exposto concordo em responder o questionário assim como autorizar a pesquisa no serviço de patologia para verificar a presença de biomarcadores como acima me foi exposto. Tenho também a plena ciência da garantia de confidencialidade, bem como de esclarecimentos sempre que

desejar. Diante do exposto e de espontânea vontade, expresso minha concordância em participar deste estudo. Assinatura do voluntário Assinatura do responsável pela obtenção do TCLE Local,

=====

Comitê de Ética em Pesquisa da UFSM: Av. Roraima, 1000 - 97105-900 - Santa Maria - RS - 2º andar do prédio da Reitoria. Telefone: (55) 3220-9362 - E-mail: cep.ufsm@gmail.



## **Anexo 4 – Termo de Confidencialidade**

Título do projeto: Expressividade do P53 e do P16 em Pacientes com Carcinoma de Células Escamosas de Boca, Laringee Faringe na Disseminação Linfonodal

Pesquisador responsável: Dra. Maria da Graça Caminha Vidal

Instituição/Departamento: Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do HU Telefone: 055-32208552/ 05532213704

Os pesquisadores do presente projeto se comprometem a preservar a privacidade e a identidade dos participantes desta pesquisa, cujos dados serão coletados, exclusivamente, por meio do material das peças de biópsias e cirúrgicas dos tumores diagnosticados como carcinoma de células escamosas para análise de imuno histoquímica desses tumores localizados na cavidade oral, laringe e faringe dos pacientes tratados no Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do HUSM –UFSM-RS. Além dos dados obtidos pela análise da imunoexpressividade através do material da patologia, haverá os dados das entrevistas com os interesses específicos para os fatores de risco, hábitos e etnia dos pacientes, obtidos através do questionário específico da pesquisa. Estes dados formarão o banco de dados e serão mantidos em total sigilo com a preservação da identidade dos mesmos. As informações desses dados serão armazenados em um programa de soft word que ficará no computador do serviço de cabeça e pescoço cuja a senha e cujo computador é da responsabilidade da pesquisadora principal, ninguém mais tem autorização para trabalhar nesse computador pois, o mesmo foi adquirido por projeto anterior da própria pesquisadora. Informam, ainda, que estas informações serão utilizadas, única e exclusivamente, para execução do presente projeto. As informações somente poderão ser divulgadas de forma anônima e serão mantidas no Banco de Dados do Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço na UFSM - Avenida Roraima, 1000, prédio xx, sala xx - 97105-900 - Santa Maria- RS, por um período de cinco anos, sob a responsabilidade de Dra. Maria da Graça Caminha Vidal. Após este período os dados serão destruídos.

Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFSM em...../...../....., e recebeu o número Caae ..... Santa Maria, Assinatura do pesquisador responsável. Comitê de Ética em Pesquisa da UFSM: Av. Roraima, 1000 - 97105-900 - Santa Maria –RS

## **9. Apêndice**

---

**Apêndice – Registro de expressividade (imunohistoquímica) p53 e p16 nos pacientes com CEC de boca, laringe e faringe**

Nome: xxxxx

Same:

Sexo:

Etnia:

Idade:

Profissão:

FATORES DE RISCO: ( ) Tabagismo presente ( ) menos que uma carteira por dia

( ) 1 carteira por dia ( ) 2 carteiras por dia ( ) 3 carteiras por dia

( ) + que 3 carteiras por dia ( ) cigarro feito manual “palheiro” ( ) cachimbo ( ) charuto

( ) ex-tabagista ( ) menos de 1 ano ( ) 1 a 2 anos ( ) 2 a 5 anos ( ) + de 5 anos

Não tabagista ( )

Etilismo ( ) sim tipo ( ) +/++++ ( ) ++/++++ ( ) +++/++++ ( ) ++++/++++

Chimarrão ( ) sim ( ) não Infecção por HPV ( ) sim ( ) não Outro ( )

Sítio Primário de CEC:

A) Boca: ( ) língua ( ) lábio ( ) gengiva ( ) mucosa jugal ( ) rebordo alvéolo dentário

( ) soalho oral ( ) Palato duro ( ) ]área retromolar

B) Laringe: ( ) glote ( ) supraglote ( ) subglote ( ) transglótico

C) Faringe: ( ) nasofaringe

( ) Orofaringe: base de língua, amígdala / pilar amigdaliano, palato mole

( ) Hipofaringe: Seio piriforme, parede posterior lateral / posterior da faringe  
área retrocricóidea.

Estádio Clínico: ( ) I ( ) II ( ) III ( ) IV  
( ) IV

Estadio Patológico: ( ) I ( ) II ( ) III

Exames: Naso ou telelaringoscopia ( )

Tomografia / Ressonância ( )

Tratamento: ( ) Cirurgia SOMENTE ( ) Cirurgia + RT e QT pós-operatória ( ) QT neo +  
Cirurgia e Rt- QT concomitantes pós-operatória ( ) QT neo + Cirurgia e Rt pós-operatória  
( ) RT somente ( ) RT + QT concomitantes ( ) QT neo + RT e QT concomitantes

Expressividade : P 53 ( ) sim ( ) não a) Biópsia b) Peça cirúrgica: tumor / linfonodos

p 16 ( ) sim ( ) não a) Biópsia b) Peça cirúrgica: tumor / linfonodos

Tempo Livre de doença após término de tratamento ( ) até 6 meses ( ) 6 meses a 1 ano  
( ) 1 ano a 2 anos ( ) mais de 2 anos ( ) não teve resposta

Estado atual do paciente: ( ) bem sem sinal de doença ativa ( ) estável com lesão residual  
mas sem sintomas ( ) estável com lesão residual mas com sintomas ( ) com muita doença  
ativa sintomático debilitante ( ) Óbito pela doença/outra causa

## ***10. Bibliografia consultada***

---

## **Bibliografia Consultada**

Pereira JCR. Bioestatística em outras palavras. 1ed. São Paulo: EDUSP, 2010.

Hollander M, Wolfe DA, Chicken E. Nonparametric statistical methods. New Jersey: John Wiley & Sons, 1973.